

УДК 577.161.5 : 577.158.4

БИОХИМИЯ

Г. В. Априкян, В. А. Шагинян и Г. Г. Бунятян

**Влияние ротенона и витамина  $K_3$  на окислительное деаминирование  
 глутаминовой кислоты в митохондриальной  
 фракции печени белых крыс**

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятяном 8/V 1975)

Ранее нами было показано, что АДФ при определенных экспериментальных условиях в значительной степени стимулирует образование аммиака из глутаминовой кислоты (ГК) в митохондриальной фракции (МФ) мозга и печени белых крыс (1). На основании собственных и литературных данных сделано заключение, что действие АДФ на продукцию аммиака из ГК осуществляется через глутамат-дегидрогеназный (ГДГ) путь, а основной причиной неэффективности ГДГ пути в образовании аммиака из ГК в условиях *in vitro* является чрезмерная восстановленность пиридин-нуклеотидных коферментов (1).

Между тем, механизм стимулирующего действия АДФ на интенсивность окислительного деаминирования ГК в интактных митохондриях оставался не выясненным, имеющиеся же сведения относились лишь к кристаллической ГДГ (2). Исходя из этого, представляло определенный интерес изучить, с одной стороны, действие на указанный процесс ротенона, который эффективно подавляет окисление пиридин-нуклеотидных коферментов, с другой,—витамина  $K_3$  (менадиона), который не менее эффективно окисляет эти коферменты (1,3).

Исследования проводили на зрелых белых крысах, содержащихся на обычном лабораторном рационе. МФ печени получали по ранее описанной методике и инкубировали в специально подобранном нами К—фосфатном буфере (4). На каждую пробу брали 1 мл митохондриальной взвеси, что соответствовало 500 мг свежей ткани печени. ГК брали в конечной концентрации 10 мМ, АДФ—2 мМ, малонат—20 мМ, ротенон—0,0064 и 0,0128 мМ, витамин  $K_3$ —0,01 мМ. Инкубацию проводили в атмосфере кислорода при 37° в течение 40 минут. Суммарный аммиак (свободный аммиак+амидоазот глутамина) определяли микрометодом Зелигсона (5) в модификации Силаковой (6), а поглощение кислорода манометрическим методом Варбурга в течение 30 минут после 10-минутного выравнивания температуры.

Как видно из табл. 1, ротенон заметно подавляет эндогенное дыхание МФ. АДФ, напротив, усиливает его. При наличии в среде АДФ

ротенон ингибирует дыхание в 3,8 раза. ГК в присутствии ротенона

Таблица 1

Действие ротенона на окисление глутаминовой кислоты  
(мкмоль  $O_2/g$  свежей ткани/30 минут) в митохондриальной фракции печени

Контроль		5,61±0,65	(7)
Ротенон	количество	1,07±0,27	(6)
	разница с контролем	-4,54	$p < 0,001$
АДФ	количество	8,82±1,12	(5)
	разница с контролем	+3,21	$p < 0,001$
АДФ+Ротенон	количество	2,34	(2)
	разница с АДФ	-6,48	
ГК+Ротенон	количество	2,05	(2)
	разница с ротеноном	+0,98	
ГК+Малонат	количество	10,97±0,75	(10)
	разница с контролем	+5,36	$p < 0,001$
ГК+Малонат+АДФ	количество	18,96±0,93	(12)
	разница с АДФ	+10,14	$p < 0,001$
ГК+Малонат+Ротенон	количество	2,65±0,26	(10)
	разница с ротеноном	-1,58	$p < 0,005$
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	количество	2,5±0,28	(11)
	разница с АДФ+РОТ	+0,16	$p > 0,1$

окисляется слабо. Значительно активнее, как и следовало ожидать, она окисляется в присутствии малоната. АДФ в этих условиях выражено стимулирует дыхание на ГК, что согласуется с результатами предыдущих наших исследований (1). Следует отметить, что ротенон в присутствии малоната полностью подавляет дыхание на ГК. В этих условиях стимулирующее действие АДФ на окисление ГК исчезает.

Исходя из вышесказанного, интересно было изучить процесс окислительного деаминарования ГК в аналогичных условиях экспери-

Таблица 2

Действие ротенона на окислительное деаминарование глутаминовой кислоты (мкмоль азота аммиака/g свежей ткани/40 минут) в митохондриальной фракции печени

До-инкубации		0,27±0,02	(11)	
После инкубации	Контроль	количество	1,59±0,12	(17)
		разница	+1,32	$p < 0,001$
	Ротенон	количество	1,4±0,12	(15)
		разница с контролем	-0,19	$p > 0,1$
	АДФ	количество	2,73±0,13	(14)
		разница с контролем	+1,14	$p < 0,001$
	АДФ+Ротенон	количество	1,87±0,06	(12)
		разница с АДФ	-0,86	$p < 0,05$
	ГК+Ротенон	количество	1,93±0,08	(3)
		разница с ротеноном	+0,53	$p > 0,05$
ГК+Малонат	количество	9,45±0,56	(16)	
	разница с контролем	+7,86	$p < 0,001$	
ГК+МАЛ+АДФ	количество	18,39±0,67	(17)	
	разница с АДФ	+15,66	$p < 0,001$	
ГК+МАЛ+РОТ	количество	3,4±0,18	(17)	
	разница с ротеноном	+2,0	$p < 0,001$	
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	количество	4,74±0,33	(15)	
	разница с АДФ+РОТ	+2,87	$p < 0,025$	

мента. Из табл. 2 видно, что при инкубации МФ образуется определенное количество суммарного аммиака. При добавлении ротенона этот процесс не подвергается существенным изменениям. АДФ сам по себе является продуцентом заметного количества аммиака, интенсивность образования которого несколько подавляется в присутствии ротенона.

Нашими предыдущими исследованиями было установлено, что добавленная к МФ печени ГК как в присутствии АДФ, так и в его отсутствие не является источником образования аммиака (1). И при наличии ротенона (табл. 2) уровень образования аммиака из ГК не претерпевает сколько-нибудь заметных изменений. Значительная продукция аммиака наблюдается в присутствии малоната, возрастая по сравнению с контролем почти в 5 раз. АДФ в высокой степени стимулирует этот процесс, увеличивая образование аммиака в 2 раза. Ротенон, напротив, сильно подавляет продукцию аммиака из ГК в присутствии малоната. На этом фоне АДФ не оказывает особого действия на уровень аммиакообразования.

Следовательно, при подавлении окисления пиридин-нуклеотидных коферментов ротеноном образование аммиака из ГК в присутствии малоната почти полностью прекращается, и на этом фоне АДФ не проявляет своего характерного стимулирующего действия.

В следующей серии исследований мы использовали витамин К<sub>2</sub>, который, как уже отмечалось, эффективно окисляет пиридин-нуклеотидные коферменты (5). В его присутствии предстояло проследить за непосредственным действием АДФ на активность ГДГ в условиях по-

Таблица 3

Действие ротенона и витамина К<sub>2</sub> на окисление глутаминовой кислоты  
(мкмоль О<sub>2</sub>/г свежей ткани/30 минут) в митохондриальной фракции печени

Контроль		3.74±0.21	(9)
Ротенон	количество	1.01±0.25	(6)
АДФ	разница с контролем	-2.73	p<0.001
	количество	6.37±0.53	(8)
АДФ+Ротенон	разница с контролем	-2.63	p<0.005
	количество	1.85±0.32	(6)
Витамин К <sub>2</sub>	разница с АДФ	-4.52	p<0.001
	количество	1.89±0.41	(5)
АДФ+Витамин К <sub>2</sub>	разница с контролем	-1.85	p<0.05
	количество	2.69±0.18	(9)
ГК+Малонат	разница с вит. К <sub>2</sub>	+0.8	p>0.1
	количество	8.88±0.82	(4)
ГК+Малонат+АДФ	разница с контролем	+5.14	p<0.005
	количество	15.93±1.18	(5)
ГК+Малонат+Ротенон	разница с АДФ	-9.56	p<0.001
	количество	1.91±0.08	(11)
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	разница с ротеноном	+0.9	p<0.005
	количество	1.62±0.21	(13)
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ.К <sub>2</sub>	разница с АДФ+РОТ	-0.23	p>0.1
	количество	8.49±0.43	(6)
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ.К <sub>2</sub> +АДФ	разница с вит.К <sub>2</sub>	+6.6	p<0.001
	количество	12.61±0.51	(7)
	разница с АДФ+РОТ	+10.76	p<0.001

давления окисления пиридин-нуклеотидных коферментов ротеноном. Следует отметить, что для получения более выраженного эффекта со стороны ротенона, последний применен в концентрации вдвое большей, нежели в предыдущей серии исследований.

При добавлении к инкубационной среде одного витамина  $K_3$ , как видно из табл. 3, интенсивность эндогенного дыхания МФ печени выражено снижается. Витамин  $K_3$  в присутствии АДФ не оказывает заметного действия на дыхательную активность. Данные этой таблицы подтверждают результаты предыдущей серии исследований относительно эффективного подавления ротеноном окисления и деаминирования ГК в присутствии малоната. При добавлении в этих условиях витамина  $K_3$  ингибирующее действие ротенона не проявляется, а дыхательная активность восстанавливается почти до первоначального уровня. На этом фоне окисление ГК четко стимулируется в присутствии АДФ.

Таблица 1

Действие витамина  $K_3$  на окислительное деаминирование глутаминовой кислоты (мкмоль азота аммиака/г свежей ткани/40 минут) в митохондриальной фракции печени

До инкубации			$0.23 \pm 0.03$	(16)
ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ	Контроль	количество	$1.2 \pm 0.05$	(28)
	Ротенон	разница	$-0.97$	$p < 0.001$
	АДФ	количество	$1.24 \pm 0.1$	(13)
	АДФ+Ротенон	разница с контролем	$+0.04$	$p > 0.1$
	АДФ+Ротенон	количество	$2.37 \pm 0.08$	(16)
	АДФ+Ротенон	разница с контролем	$+1.17$	$p < 0.001$
	Витамин $K_3$	количество	$1.87 \pm 0.06$	(12)
	Витамин $K_3$	разница с АДФ	$-0.5$	$p < 0.05$
	АДФ+Витамин $K_3$	количество	$1.3 \pm 0.08$	(12)
	АДФ+Витамин $K_3$	разница с контролем	$-0.1$	$p > 0.1$
	ГК+Малонат	количество	$2.13 \pm 0.14$	(16)
	ГК+Малонат	разница с вит $K_3$	$+0.83$	$p < 0.001$
	ГК+Малонат+АДФ	количество	$8.96 \pm 0.29$	(14)
	ГК+Малонат+АДФ	разница с контролем	$+7.76$	$p < 0.001$
	ГК+Малонат+РОТ	количество	$17.88 \pm 0.58$	(14)
ГК+Малонат+РОТ	разница с АДФ	$+15.51$	$p < 0.001$	
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	количество	$2.34 \pm 0.11$	(27)	
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	разница с ротеноном	$-1.1$	$p < 0.001$	
ГК+МАЛ+РОТ+АДФ	количество	$3.23 \pm 0.1$	(30)	
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ. $K_3$	разница с АДФ+РОТ	$-1.36$	$p < 0.001$	
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ. $K_3$	количество	$11.18 \pm 0.38$	(16)	
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ. $K_3$	разница с вит $K_3$	$-9.88$	$p < 0.001$	
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ. $K_3$	количество	$16.22 \pm 0.44$	(16)	
ГК+МАЛ+РОТ+ВИТ. $K_3$	разница с АДФ+РОТ	$+14.35$	$p < 0.001$	

Из табл. 4 видно, что витамин  $K_3$  не оказывает влияния на продукцию аммиака из эндогенных источников и из АДФ. В то же время он полностью купирует подавляющее действие ротенона на образование аммиака из ГК в присутствии малоната. В этих условиях восстанавливается характерное стимулирующее действие АДФ на интенсивность окислительного деаминирования ГК.

Приведенные в таблицах и полученные ранее (1) данные позво-

ляют сделать заключение, что в интактных митохондриях добавленная ГК в результате переаминирования становится источником образования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, которая окисляется в цикле трикарбоновых кислот через янтарную кислоту. Малонат, ингибируя окисление последней, предотвращает обратный транспорт электронов в дыхательной цепи ( $9-12$ ), способствуя тем самым окислению пиридин-нуклеотидных коферментов, что в свою очередь создает благоприятные условия для стимулирования окислительного деаминирования ГК. Можно было допустить, что в интактных митохондриях печени АДФ усиливает образование аммиака из ГК через ГДГ путь, с одной стороны, путем стимулирования окисления НАД-Н, с другой, — в качестве эффективного аллостерического активатора ГДГ ( $13-14$ ). Однако последнее свойство АДФ было показано при работе с кристаллическим ферментом.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ингибировании окисления НАД-Н ротеноном и, следовательно, исключении возможности стимулирования этого процесса со стороны АДФ интенсивность окислительного деаминирования ГК сводится к нулю. С другой стороны, на этом фоне при неферментативном окислении пиридин-нуклеотидов витамином  $K_3$  наблюдается интенсивное деаминирование ГК, которое стимулируется добавлением АДФ, что может происходить лишь при активировании ГДГ.

Вышеизложенное позволяет сделать заключение, что в интактных митохондриях печени АДФ стимулирует окислительное деаминирование ГК и в качестве аллостерического активатора ГДГ.

Институт биохимии  
Академии наук Армянской ССР

Գ. Վ. ԱՊՐԻՅԱՆ, Վ. Ա. ՇԱԼԻՅԱՆ, Գ. Ը. ԽՈՒՆՅԱԹՅԱՆ

Ռոտենոնի և վիտամին  $K_3$ -ի ազդեցությունը գլյուտամինաթթվի օքսիդացիոն ղեամինացման վրա սպիտակ առնետների լյարդի ինտակտ միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում

Լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում ոռտենոնը մեծ չափով ճնշում է գլյուտամինաթթվի ( $\text{ԳԽ}$ ) օքսիդացումը և ղեամինացումը մալոնատի ներկայությամբ: Նման պայմաններում ԱՎՖ-ը չի դրսևվորում իր խթանող ազդեցությունը վերը նշված պրոցեսների վրա:

Վիտամին  $K_3$ -ը վերացնում է ոռտենոնի արդելակիչ ազդեցությունն ու այդ պայմաններում ԱՎՖ-ը նորից դրսևվորում է իրեն բնորոշ խթանիչ ազդեցությունը:

Ստացված տվյալների հիման վրա հետևություն է արվում այն մասին, որ ԱՎՖ-ի ազդեցությունը  $\text{ԳԽ}$ -ից ամոնիակի առաջացման վրա իրականանում է  $\text{ԳԽ}$ -ի ղեհիդրոզենազայի ճանապարհով: Լյարդի ինտակտ միտոքոնդրիաներում ԱՎՖ-ը խթանում է  $\text{ԳԽ}$ -ի օքսիդացիոն ղեամինացումը մի կողմից

իրրև ԳՄ-ի դեհիդրոգինազիայի ալոստերիկ ակտիվատոր, մյուս կողմից նպաստում է պիրիդիննուկլեոտիդային կոֆերմենտների օքսիդացմանը շնչառական շղթայում էլեկտրոնների տրանսպորտի ուժեղացման շնորհիվ:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- <sup>1</sup> Г. В. Априкян и В. А. Шагинян, Вопросы биохимии мозга, изд. АН Арм.ССР, 8, 91(1973) <sup>2</sup> J. A. Olson, C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem., 197, 67(1952). <sup>3</sup> H. J. Strecker, Arch. Biochim. Biophys., 46,128(1953). <sup>4</sup> S. Pora, J. M. Tager, A. Francavilla, E. J. De Haan and E. Quagliariello, Biochim. Biophys. Acta, 131,14(1967) <sup>5</sup> C. Saccone, BBA Library, vol. 7, Elsevier, Amsterdam, p. 165, 1966 <sup>6</sup> Г. В. Априкян и В. А. Шагинян, Вопросы биохимии мозга, изд. АН Арм. ССР, 5, 17(1969) <sup>7</sup> D. Sellgson, H. Sellgson, J. Lab. Clin. Med., 38, 324(1951). <sup>8</sup> А. И. Сулакова, Г. П. Труш и А. Являкова, Вопр. мед. химии, 5, 538 (1962) <sup>9</sup> B. Chance, G. R. Williams, Adv. Enzymol. 17, 65(1956). <sup>10</sup> M. Klingenberg, W. Stenczka, E. Ritt, Biochem. Z., 332, 47(1959). <sup>11</sup> L. M. Birt, W. Bartley, Biochem. J., 70, 427 (1960). <sup>12</sup> H. Löw, I. Vallin, Biochim. Biophys. Acta, 69, 361(1963). <sup>13</sup> C. Frieden, J. Biol. Chem., 238, 3286 (1963) <sup>14</sup> C. Frieden, J. Biol. Chem, 240, 2028 (1965).