

УДК 577.71

БИОХИМИЯ

Ж. А. Паронян, Э. Г. Адунц, Г. Г. Бунятян, Г. В. Априкян

Роль глутаматдегидрогеназы в восстановительном аминировании
α-кетоглутаровой кислоты в митохондриях печени
белых крыс при старении

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

Предыдущими исследованиями было показано (1-4), что в митохондриальных фракциях печени и мозга в образовании аммиака из аминокислот наряду с другими путями определенную роль играет глутаматдегидрогеназный (ГДГ), хотя в литературе этот путь до недавнего времени считался неэффективным.

В настоящей работе приводятся данные по сравнительному изучению роли ГДГ в синтезе глутаминовой кислоты (ГК) и регуляции этого процесса в митохондриальной фракции печени при старении. В качестве экспериментальных животных использовали половозрелые (90-дневные) и старые (720-дневные) белые крысы. Митохондриальную фракцию получали по ранее описанному методу (5). На каждую пробу брали 1 мл митохондриальной взвеси, что соответствовало 500 мг свежей ткани. Инкубацию проводили при 37° в атмосфере кислорода 40% в К-фосфатном буфере (5). В работе использовали ГК, α-кетоглутаровую кислоту (КГ), аммиак по 10 мМ, малонат 20 мМ, АДФ 2 мМ, ротенон 6.4×10^{-3} мМ в конечных концентрациях. Дыхание определяли манометрическим методом Варбурга, количество аммиака — микродиффузионным (6). При определении аммиака учитывали амидоазот глутамина. Об интенсивности восстановительного аминирования судили по убыли аммиака.

Результаты проведенных исследований (табл. I) показали, что при инкубации митохондриальной фракции печени зрелых крыс происходит заметное образование аммиака из эндогенных источников. Добавленный аммиак в присутствии КГ заметно утилизируется, при инкубации (табл. I) в то время как без нее не подвергается особым сдвигам. Следует отметить, что КГ значительно снижает и уровень эндогенного аммиака. Данные табл. I свидетельствуют о том, что при наличии КГ образование аммиака из АДФ не улавливается, что можно объяснить использованием образовавшегося аммиака на восстановительное амини-

рование. АДФ в весьма высокой степени стимулирует восстановительное аминирование КГ, что можно считать непосредственным доказательством действия АДФ на ГДГ в интактных митохондриях печени как аллостерического активатора этого фермента.

Исследования показали, что аммиак оказывает подавляющее действие на эндогенное дыхание, как при наличии АДФ, так и без него. Сходное действие оказывает аммиак и на интенсивность окисления КГ, особенно, в присутствии АДФ. Последний в значительной степени повышает окисление КГ, что можно объяснить стимулированием с одной стороны окисления пиридиннуклеотидных коферментов, с другой — перехода сукцинил-КоА в сукцинат.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что существующие альтернативные пути превращений КГ в зависимости от экспериментальных условий могут быть направлены либо в сторону ее окисления, либо — восстановительного аминирования. Однако нам представляется, что из-за очень низкого содержания аммиака и КГ в животном организме, последний путь может функционировать в отдельных компартментах при локальном увеличении количества указанных веществ. Приведенные и полученные ранее данные свидетельствуют о том, что, хотя в опытах с кристаллической ГДГ обратная реакция в 10 раз эффективнее прямой реакции, при создании максимально благоприятных условий для обратной реакции в интактных митохондриях печени она эффективнее прямой реакции всего лишь в 2 раза (при окислительном деаминировании нами получено 10,42 мкмоль аммиака/г свежей ткани. При тех же условиях 21,76 мкмоль аммиака/г свежей ткани расходуется на восстановительное аминирование КГ). Приведенные данные позволяют заключить, что при нормальных физиологических условиях ГДГ играет определенную роль в окислительном деаминировании ГК. Данные табл. 2 показывают, что содержание аммиака в митохондриальной фракции печени выражено увеличивается в старческом возрасте, и способность к образованию аммиака из эндогенных источников несколько снижается. Интенсивность образования аммиака из АДФ в старческом возрасте сохраняется. Эти данные согласуются с результатами предыдущих наших исследований (⁶). Хотя интенсивность восстановительного аминирования КГ без активаторов выражено повышается в старческом возрасте, тем не менее, вследствие регулирующего действия АДФ восстановительное аминирование КГ в условиях стимулирования АДФ у половозрелых и старых животных происходит с одинаковой интенсивностью. Регулирующая роль АДФ в интактных митохондриях печени старых животных нами установлена и в отношении прямой реакции ГДГ (^{4,7,8}).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ротенон не оказывает существенного влияния на образование аммиака из эндогенных источников, в то время как выражено стимулирует восстановительное аминирование КГ при наличии добавленного аммиака. Действие ротенона проявляется с той же интенсивностью у старых животных. Стимулирующее действие ротенона на восстановительное аминирование КГ

Таблица 1

Роль глутамат-дегидрогеназы в восстановительном аминировании α -кетоглутаровой кислоты (мкмоль азота аммиака/г свежей ткани/40' в митохондриях печени зрелых белых крыс. Действие АДФ

До инкуб.			После инкубации															
Фиксированный контроль	NH ₃ + КГ		Контр.		АДФ		NH ₃		КГ		NH ₃ + АДФ		КГ + АДФ		NH ₃ + КГ		NH ₃ + КГ + АДФ	
		Разница с контролем		Разница		Разница с контролем		Разница		Разница с контролем		Разница с NH ₃		Разница с КГ		Разница		Разница
0.25+ 0.03 (19)	32.43+ 0.52 (21)	32.18	1.26+ 0.04 (14)	1.01	3.19+ 0.05 (21)	1.93	33.98+ 1.21 (14)	1.55	0.41+ 0.04 (17)	0.85	38.26+ 0.82 (13)	4.28	0.49+ 0.05 (16)	0.09	25.83+ 0.48 (16)	6.6	12.2+ 0.2 (17)	13.5
	p< 0.001		p< 0.001		p< 0.001		p> 0.20		p< 0.001		p< 0.001		p> 0.1		p< 0.001		p< 0.001	

Роль глутамат-дегидрогеназы в восстановительном аминировании α -кетоглутаровой кислоты (по мкмоль азота аммиака/г свежей ткани/40') в митохондриях печени белых крыс при старении. Действие АДФ и ротенона.

[illegible]

Таблица 3

Интенсивность окисления α -кетоглутаровой кислоты (мкмоль O_2 /г свежей ткани/40') при ее восстановительном аминировании в митохондриях печени белых крыс при старении. Действие АДФ и ротенона

Возраст в днях	Контроль	АДФ		$\text{NH}_3 + \text{KГ}$		$\text{NH}_3 + \text{KГ} + \text{АДФ}$		$\text{NH}_3 + \text{KГ} + \text{Ротенон}$		$\text{NH}_3 + \text{KГ} + \text{АДФ} + \text{ротенон}$		Ротенон	
			Разница с контроль		Разница с контроль		Разница с $\text{NH}_3 + \text{KГ}$		Разница с $\text{NH}_3 + \text{KГ}$		Разница с $\text{NH}_3 + \text{KГ} + \text{ротенон}$		Разница с контролем
90	1.69 ± 0.18 (18)	6.66 ± 0.34 (19) $p < 0.001$	4.97	5.32 ± 0.37 (8) $p < 0.001$	3.63	15.88 ± 0.1 (15) $p < 0.001$	10.56	2.28 ± 0.21 (11) $p < 0.001$	-3.04	6.97 ± 0.3 (12) $p < 0.001$	4.69	0.13 ± 0.01 (6) $p < 0.001$	-1.56
720	0.85 ± 0.2 (14)	2.79 ± 0.34 (14) $p < 0.001$	1.94	3.37 ± 0.4 (14) $p < 0.001$	2.52	16.4 ± 0.64 (12) $p < 0.001$	13.03	0.67 ± 0.13 (13) $p < 0.001$	-2.7	6.62 ± 0.58 (11) $p < 0.001$	5.95		

можно объяснить его подавляющим действием на окисление пиримидиновых нуклеотидных коферментов (табл. 2).

При наличии ротенона АДФ выражено стимулирует обратную реакцию ГДГ, что у зрелых и старых животных происходит с одинаковой интенсивностью. Стимулирующее действие АДФ на восстановительное аминирование КГ значительно сильнее в отсутствие ротенона. Следует отметить, что использование аммиака на синтез ГК при совместном добавлении аммиака, КГ и АДФ значительно подавляется ротеноном (табл. 2), хотя в данных условиях интенсивность окисления КГ в значительной степени подавляется (табл. 3). Нам представляется, что в отмеченных условиях проявляется ингибирующее действие ротенона на ГДГ (*).

Как видно из данных табл. 3 эндогенное дыхание митохондриальной фракции печени старых животных четко снижается как без, так и при добавлении АДФ. Хотя АДФ в весьма высокой степени стимулирует эндогенное дыхание, тем не менее этот эффект АДФ заметно снижается у старых животных. Необходимо отметить, что интенсивность поглощения кислорода при совместном применении КГ и аммиака четко снижается у старых животных, хотя стимулирование дыхания при добавлении КГ более выражено у старых животных. Так, при добавлении КГ у половозрелых животных дыхание повышается на 214%, а у старых животных—на 300%. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что у старых животных КГ окисляется менее интенсивно, чем у половозрелых животных. АДФ в весьма высокой степени стимулирует окисление КГ: у половозрелых в 3 раза, а у старых 5. В условиях стимулирования АДФ уровень поглощения кислорода одинаков у обеих возрастных групп. В данном случае опять-таки проявляется регулирующее влияние АДФ.

Сопоставление вышеуказанных результатов с ранее полученными свидетельствует о том, что АДФ в старческом возрасте является эффективным регулятором на измененном фоне протекания прямой и обратной реакции ГДГ и превращения АДФ записящих субстратов окисления.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ժ. Ա. ՊԱՐՈՆՅԱՆ, Է. Դ. ԱԴՈՐՆՅԱՆ, Գ. Զ. ԲՈՐԻՏԱՔՅԱՆ, Գ. Վ. ԱՊՐԻԿՅԱՆ

Էլուտամինաթրվի դեհիդրոգենազայի դերը α -կետոգլուտաթրվի վերականգնողական ամինացման մեջ սպիտակ առնետների լյարդի միտոխոնդրիաներում ձերուրյան ժամանակ

Կատարված հետազոտությունները դույց են տվել, որ շնայած մաքուր էլուտամինաթրվի դեհիդրոգենազայի (ԿԴԶ) հետ կատարված փորձերում հակառակ ունկնդրան ուղիղի հետ համեմատած 10 անգամ ուժեղ է ընթանում.

բարենտրաստ պայմաններ ստեղծելու դեպքում լյարդի միտոքոնդրիաներում այն ընդամենը 2 անգամ է ուժեղ, α-կետոգլուտարաթթուն (ԿԳ) ծեր կենդանիների մոտ հասունների հետ համեմատած թույլ է օքսիդանում, իսկ ԱԴՖ-օգտագործելու դեպքում նրա օքսիդացումը 2 անգամից կենդանիների մոտ էլ ընթանում է նույն ուժգնությամբ, ԿԴ-ի փերականգնողական ամինացումը ամոնիակ ավելացնելու դեպքում, ընդհանրապես, ավելի ուժեղ է ընթանում ծեր կենդանիների մոտ, իսկ ԱԴՖ-ի օգտագործման դեպքում երկու հասակի կենդանիների մոտ էլ ընթանում է նույն մակարդակի վրա: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ԱԴՖ-ը ծեր հասակում կարող է հաջողությամբ օգտագործվել իրեն ԿԴԷ-ի կարգավորիչ:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱՆԻՆՔՆԵՐ

- ¹ Գ. Վ. Արիկյան, Վ. Ա. Շագինյան, Ջ. Ա. Սարգսյան, ДАН Арм ССР, т. 51, 115 (1970).
² Գ. Խ. Բунятыան, Գ. Վ. Արիկյան, Վ. Ա. Շագինյան, Ջ. Ա. Սարգսյան, Вопросы биохимии мозга, 6, 53 (1970).
³ Գ. Վ. Արիկյան, Գ. Խ. Բунятыան, Վ. Ա. Շագինյան, Вопросы биохимии мозга, 6, 67 (1970).
⁴ Գ. Վ. Արիկյան, Գ. Ա. Մկրտչյան, Գ. Խ. Բунятыան, Журн. эвол. биохим. и физиол., 7, 467 (1971).
⁵ Գ. Վ. Արիկյան և Վ. Ա. Շագինյան, Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм. ССР, 5, 17 (1969).
⁶ А. И. Силакова, Г. П. Труш, А. Являкова, Вopr. химии, 5, 538 (1962).
⁷ Գ. Խ. Բунятыան, Գ. Վ. Արիկյան, Գ. Ա. Մկրտչյան, Вопросы биохимии мозга, Изд. АН АрмССР, 6, 87 (1970).
⁸ Գ. Վ. Արիկյան, Գ. Ա. Մկրտչյան, ДАН Арм ССР, т. 52, 173 (1971).
⁹ R. A. Bulow, Biochem., 6, 1088 (1967).