

АМИДНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ И АММИАКООБРАЗОВАНИЕ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

БАДАЛЯН Н. А., ДАВТЯН М. А.

Ереванский государственный университет

Изучали процесс аммиакообразования, наблюдаемый при 3-часовой инкубации гомогената головного мозга крыс в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере, pH 7,4. Показано, что до инкубации в гомогенате содержится азотсодержащее лабильное соединение, продуцирующее аммиак в течение инкубации и легко расщепляющееся насыщенным раствором K_2CO_3 (поташ) с выделением аммиака. Это соединение осаждается ТХУ, но является растворимым в органических липорастворителях и экстрагируется из ТХУ-осадка этанол-хлороформной смесью (2:1). Исследовали содержание амидных групп белков мозга крыс до и после инкубации. Установлено, что деаμίдирование белков не играет роли в аммиакообразовании, наблюдаемом при инкубации гомогенатов мозга крыс.

Установлено, что при преобладании процессов возбуждения в мозгу животных происходит деаμίдирование белков. В частности, при кратковременном электрическом возбуждении [1, 2], при гипероксии [3, 4], при гипогликемических судорогах, вызванных введением инсулина [5, 6], параллельно интенсивному израсходованию энергетических субстратов расщепляются и амидные группы белков мозга. И наоборот, при развитии тормозных процессов в мозгу, в частности при медикаментозном сне, вызванном введением мединала [7], происходит аμίдирование белков мозга. Указанные и ряд других данных позволяют приписать процессам аμίдирования и деаμίдирования белков определенную роль в механизмах аммиакообразования и обезвреживания аммиака в головном мозгу. Однако следует отметить отсутствие прямых доказательств относительно участия амидных групп белков в процессе аммиакообразования в мозгу при нормальной жизнедеятельности. Лишь исследования Арутюняна и Микаелян [8] однозначно доказывают, что наблюдаемое при декапитации животных резкое увеличение содержания аммиака в мозгу в основном обусловлено деаμίдированием белков.

Намн была поставлена задача исследовать участие амидных групп белков в аммиакообразовании, наблюдаемом в течение инкубации гомогенатов мозга.

Материалы и методы

Подопытные животные (белые крысы массой 150—200 г) были разделены на две группы. Крыс I группы декапитировали, извлекали мозг и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере, pH 7,4. До и после 3-часовой инкубации гомогенатов в ТХУ-экстракте мозга и непосредственно в гомогенате без предварительного осаждения белков ТХУ определяли со-

держание аммиака и глутамина, в ТХУ-осадке гомогената мозга—белковый амидо-азот.

Животных II группы целиком замораживали жидким азотом, затем вскрывали черепную коробку, извлекали мозг, растирали его в жидком азоте в порошок и его навески гомогенизировали в 10%-ной ТХУ. В ТХУ-экстракте мозга определяли содержание аммиака и глутамина, в ТХУ-осадке—амидоазот белка.

Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и соавт. [9], позволяющей по разнице величин азота аммиака, вытесненного КОН и K_2CO_3 из ТХУ-экстракта определять также амидный азот глутамина. В случае определения аммиака непосредственно в гомогенате в микродиффузионный сосудик вносили гомогенат без предварительного осаждения белков ТХУ, то есть в этих условиях присутствовали все компоненты клетки, включая белки. Можно полагать, что при этом K_2CO_3 будет вытеснять свободный аммиак, не гидролизую другие известные азотсодержащие соединения.

При определении амидных групп белки предварительно очищали от азотсодержащих соединений и липидов. Очистку проводили следующим образом: ТХУ-осадок трижды промывали 5%-ной ТХУ по 15 мин, последнюю обработку проводили на водяной бане при 90° в течение 30 мин; осадок обрабатывали последовательно органическими растворителями: смесью этанола с хлороформом (2:1) 5 мл, 15 мин; этанолом, 5 мл, 15 мин; смесью этанола с эфиром (2:1) 5 мл, 15 мин (обрабатывали дважды, вторую обработку проводили при $t 70^\circ$); эфиром трижды 5 мл, 10 мин.

Амидные группы белков определяли по количеству аммиака, выделившемуся при гидролизе 20 мг белка в 5 мл 1 н. H_2SO_4 при 100° [3]. Гидролиз проводили в пробирках с обратным холодильником. При определении суммы амидных групп (САГ) белки подвергали гидролизу в течение 180 мин. При определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ)—30 мин. Для определения аммиака брали 0,5 мл надосадочной жидкости гидролизата, нейтрализовали его 1 н. NaOH и определяли содержание аммиака микродиффузионным методом. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ) определяли по разности САГ и ЛАГ.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные при исследовании содержания аммиака в ТХУ-экстракте и гомогенате головного мозга крыс до и после 3-часовой инкубации, приведены в табл. 1. Показано, что в ТХУ-экстракте

Таблица 1

Содержание аммиака в гомогенате мозга (I) и ТХУ-экстракте гомогената мозга (II) крыс при декапитации до и после 3-часовой инкубации (мкмоль/г ткани). $n=8$

Условия опыта	NH_3 , вытесненный поташем		NH_3 , вытесненный насыщенным раствором КОН		Разница (амидо- N -глутамин)	
	I	II	I	II	I	II
До инкубации	$3,50 \pm 0,27$	$7,93 \pm 0,45$	$7,94 \pm 0,15$	$21,33 \pm 0,30$	$4,41 \pm 0,26$	$13,40 \pm 0,25$
После инкубации	$16,29 \pm 1,18$	$16,41 \pm 0,77$	$18,20 \pm 0,92$	$25,54 \pm 0,60$	$1,91 \pm 0,34$	$9,13 \pm 0,34$
Образовалось за время инкубации	$12,79 \pm 1,04$	$8,48 \pm 0,45$	$10,26 \pm 0,82$	$4,21 \pm 0,31$	$2,53 \pm 0,40$	$4,27 \pm 0,43$

мозга до инкубации содержится 3,5 мкмоль аммиака/г свежей ткани, что совпадает с данными других авторов [10, 11]. Однако совершенно

неожиданно при определении количества аммиака непосредственно в гомогенате (то есть при вытеснении из гомогената— аммиака насыщенным раствором K_2CO_3), его содержание оказалось более чем в 2 раза выше—7,93 мкмоль/г. После 3-часовой инкубации происходит почти 5-кратное увеличение количества аммиака в ТХУ-экстракте—16,29 мкмоль/г, причем при определении аммиака после инкубации как в ТХУ-экстракте, так и непосредственно в гомогенате (16,41 мкмоль/г) получаются почти одинаковые величины. Это позволяет полагать, что до инкубации в гомогенате мозга содержится азотсодержащее лабильное соединение, которое легко расщепляется поташем с выделением аммиака. При инкубации гомогената, очевидно, это соединение полностью дезаминируется и обуславливает прирост аммиака на 4,43 мкмоль/г. Возможно, это соединение высокомолекулярной природы, осаждаемое ТХУ. В связи с этим уместно упомянуть исследования П. А. Кометяни относительно существования в ТХУ-осадке гомогената мозга крыс экстрагируемых подкисленными липорастворителями азотсодержащих соединений (белковой природы), которые легко дезаминируются и таким образом играют существенную роль в процессе аммиакообразования. В частности установлено, что при возбуждении, вызванном введением камфоры, параллельно увеличению содержания аммиака в мозгу заметно снижается амидированность этих белков [12, 13].

При определении в ТХУ-экстракте глутаминна оказалось, что в течение 3-часовой инкубации гомогенатов глутаминна значительно дезаминируется. Так, его содержание до инкубации составляет 4,44 мкмоль/г, после инкубации снижается до 1,91 мкмоль/г, то есть в течение инкубации дезаминируется 2,53 мкмоль/г глутаминна. Таким образом, из образовавшихся при 3-часовой инкубации 16,41 мкмоль/г аммиака—3,5 мкмоль/г составляет преобразованный аммиак, 4,43 мкмоль/г образуется в результате дезаминирования неизвестного соединения (легко расщепляемого поташем), 2,53 мкмоль/г—при дезаминировании глутаминна, а остальные 5,95 мкмоль/г очевидно образуются в результате динамического процесса аммиакообразования (возможно дезаминирование аминокислот и других соединений различными механизмами, дезаминирование белков).

При вытеснении аммиака раствором КОН непосредственно из гомогената получаются чрезмерно высокие величины (21,33 мкмоль/г). Следует полагать, что из этого количества аммиака 3,5 мкмоль/г составляет преобразованный аммиак, 4,43 и 4,44 мкмоль/г образуются в результате распада неизвестного соединения и глутаминна соответственно, а оставшиеся 8,96 мкмоль/г принадлежат другим соединениям, продуцирующим аммиак под влиянием КОН. Однако, последующие расчеты показывают, что последние соединения, продуцирующие аммиак под влиянием КОН, очевидно, не участвуют в аммиакообразовании при инкубации гомогенатов. Так, при вытеснении аммиака непосредственно из гомогената после 3-часовой инкубации образуется

25,54 мкмоль/г аммиака, из них 3,5 мкмоль/г—это преобразованный аммиак, 4,43 и 4,44 мкмоль/г—аммиак, образующийся из неизвестного соединения и глутаминна, 5,95 мкмоль/г—в результате динамического процесса аммиакообразования, а оставшиеся 7,22 мкмоль/г—из соединений, продуцирующих аммиак под влиянием КОН. Таким образом, последнее соединение, продуцирующее аммиак под влиянием КОН в течение 3-часовой инкубации гомогенатов уменьшалось незначительно (на 1,74 мкмоль/г), что дает нам право судить об их непричастности или незначительном участии в качестве источников аммиака при инкубации гомогенатов.

Так как можно допустить возможность гидролиза и амидных групп белков насыщенным раствором КОН, исследовали их содержание до и после инкубации. Данные, приведенные в табл. 2, пока-

Таблица 2

Содержание амидного азота белков мозга крыс при декапитации до и после 3-часовой инкубации гомогенатов (мкмоль/г свежей ткани), $n=8$

Условия опыта	Сумма амидных групп	Легкогидролизуемые амидные группы	Трудногидролизуемые амидные группы
До инкубации	27,02 $\pm$ 1,57	17,84 $\pm$ 1,38	9,18 $\pm$ 0,39
После инкубации	27,18 $\pm$ 1,51	21,17 $\pm$ 1,83	6,01 $\pm$ 0,59

зывают, что при 3-часовой инкубации гомогенатов содержание суммарных амидных групп белков не меняется, хотя при этом наблюдается определенное количественное перераспределение между легко- и трудногидролизуемыми амидными группами. Ряд авторов [14, 15] указывал на перераспределение между лабильными и стабильными группами белков при различных функциональных состояниях мозга в результате трансформационных изменений последних. Так или иначе, при инкубации гомогенатов мозга в суммарном содержании амидных групп белков не происходит изменения и, следовательно, они не причастны к происходящему при инкубации аммиакообразованию. Можно полагать, что дезамидирование белков играет роль лишь при происходящем взрывообразном аммиакообразовании в мозгу после декапитации, что подтверждают исследования Арутюняна и Микаелян [8], согласно которым степень амидированности белков мозга значительно выше при замораживании крыс жидким кислородом по сравнению с декапитацией. Это нашло свое подтверждение и в наших экспериментах при исследовании амидных групп белков головного мозга крыс, замороженных жидким азотом.

Как видно из табл. 3, белки головного мозга замороженных жидким азотом крыс содержат значительно больше амидных групп—59,07 мкмоль/г, чем белки мозга декапитированных крыс—27,02 мкмоль/г, что свидетельствует о быстром дезамидировании белков мозга после декапитации и полностью соответствует литературным данным [8]. Содержание аммиака в мозгу замороженных крыс со-

составляет 1,69 мкмоль/г, глутамин—5,95 мкмоль/г. Как и следовало ожидать, при декапитации в мозгу крысы возрастает количество свободного аммиака и уменьшается содержание глутамин.

Суммируя приведенные в работе данные можно заключить, что наблюдаемое при инкубировании гомогенатов головного мозга крысы аммиакообразование не обусловлено дезамидированием белков. Дезамидирование глутамин покрывает лишь около 20% образующегося аммиака, остальные 80% берут начало из других азотсодержащих соединений. Среди последних, по нашим данным, существенную роль играют соединения неизвестной природы, разрушаемые раствором K_2CO_3 и осаждаемые ТХУ, которые в течение 3-часовой инкубации продуцируют 4,43 мкмоль/г аммиака.

Таблица 3

Содержание аммиака, глутамин и белкового амидоазота в мозгу крысы, замороженного жидким азотом при гомогенизации в 10%-ной ТХУ (мкмоль/г свежей ткани)

NH ₃ , вытесненный поташем	NH ₃ , вытесненный насыщенным раствором КОН	Разница между NH ₃ , вытесненным КОН и поташем (амидо-N-глутамин)	Белковый амидо- N		
			сумма амидных групп	легкогидролизуемые амидные группы	трудногидролизуемые амидные группы
1,69±0,12	7,64±0,51	5,95±0,46	59,07±3,88	29,55±1,32	29,52±2,61

Следует учесть, что при изучении амидных групп белков ТХУ-осадка, последний предварительно освобождался от всех липорастворимых соединений путем последовательной многократной промывки различными липорастворителями. Следовательно, можно заключить, что интересующее соединение, хотя и осаждается ТХУ, но является липорастворимым и удаляется из ТХУ-осадка. Это подтвердилось в отдельной серии экспериментов при изучении содержания аммиака до и после инкубации гомогенатов как в промытом липорастворителями, так и в непромытом ТХУ-осадке. Оказалось, что при 3-часовой инкубации количество аммиака, вытесняемое растворами K_2CO_3 и КОН, уменьшается только в непромытом липорастворителями ТХУ-осадке. Исходя из этого, следовало искать интересующее нас соединение в липорастворимом экстракте ТХУ-осадка гомогената. С этой целью его подвергали до и после инкубации гомогената последовательному экстрагированию различными липорастворителями (этанол-хлороформом (2:1), этанолом, этанол-эфиром (2:1), эфиром) и в каждом из них определяли содержание аммиака.

Результаты экспериментов, приведенные в табл. 4, показали, что в этанол-хлороформном экстракте ТХУ-осадка наблюдается уменьшение содержания аммиака, вытесняемого растворами K_2CO_3 и КОН (на 2,87 мкмоль/г и 3,13 мкмоль/г соответственно). В полученных другими липорастворителями экстрактах ТХУ-осадка аммиак содержится в следовых количествах. Таким образом, продуцирующее ам-

миак при инкубации гомогенатов мозга лабильное соединение (разрушаемое раствором K_2CO_3) осаждается ТХУ и является растворимым в этанол-хлороформной смеси (2:1).

Таблица 4

Содержание аммиака в этанол-хлороформном экстракте ТХУ-осадка гомогената мозга крыс до и после 3-часовой инкубации (мкмоль/г свежей ткани), $n=5$

Условия опыта	NH_3 , вытесненный поташем	NH_3 , вытесненный KOH
До инкубации	$7,46 \pm 0,67$	$11,91 \pm 1,55$
После инкубации	$4,59 \pm 0,44$	$8,78 \pm 1,34$
Разница	$2,87 \pm 0,29$	$3,13 \pm 0,32$

В этой фракции содержатся протеолипиды, экстрагируемые различными липорастворителями, в том числе примененной нами смесью. Но так как в экспериментах экстрагированию органическими растворителями подвергали ТХУ-осадок, то, очевидно, в экстракте, помимо протеолипидов, содержались фосфатидопептиды и фосфопептиды, которые, как известно, экстрагируются подкисленными органическими липорастворителями [16, 17]. Протеолипиды и фосфатидопептиды содержат амидные группы глутамина и аспарагина пептидных цепей, а фосфопептиды содержат и фосфоамидные группы. Однако указанные амидные группы никак не могут гидролизироваться примененным нами насыщенным раствором K_2CO_3 . Известно, что экстрагируемая липорастворителями фракция ТХУ-осадка гомогената мозга дезамидируется лишь при жестком кислотном (2 н. HCl , 100° , 2 ч) или щелочном (1 н. KOH , 37° , 15 ч) гидролизе [12, 18—20]. Содержащиеся в этой фракции фосфопептиды, очевидно, не подвергаются щелочному гидролизу [21, 18]. Таким образом, можно заключить, что ни одно из известных соединений, экстрагируемых липорастворителями из ТХУ-осадка гомогената не является соединением, продуцирующим аммиак под влиянием насыщенного раствора K_2CO_3 . Очевидно, в липорастворимом осадке содержатся другие азотсодержащие соединения, исследование природы которых является предметом дальнейших исследований.

AMIDE GROUPS OF PROTEINS AND AMMONIUM FORMATION IN RAT BRAIN

BADALYAN I. A., DAVTYAN M. A.

Yerevan State University

Ammonium formation has been studied in rat brain homogenate (pH 7.4, 3h incubation). It has been demonstrated that before incubation a labile nitrogen-compound may be detected in homogenate that produces ammonia on incubation and is lazily split by saturated K_2CO_3 producing ammonia. This compound is precipitated by TCA, is readily

soluble in organic solvents and may be extracted from TCA-precipitate by ethanol-chloroform mixture (2:1).

The amount of amide groups in brain proteins has been determined before and after incubation. It has been established that ammonia formed on incubation of rat brain homogenates is not due to deamidation of proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мартинсон Э. Э., Тяхепильд Л. Я. Вopr. клинич. неврологии и психиатрии, т. 3, с. 40, 1963.
2. Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гваalia Н. В.—В сб.: III Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 193, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1963.
3. Гершеневич Э. С., Кричевская А. А. Биохимия, т. 25, с. 310, 1960.
4. Гершеневич Э. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина И. А.—В сб.: III Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 91, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1963.
5. Мартинсон Э. Э., Тяхепильд Л. Я.—В сб.: I биохим. конф. прибалт. республик и Белорусии, с. 26, Тарту, 1961.
6. Тяхепильд Л. Я. Докл. АН СССР, т. 147, № 4, с. 954, 1962.
7. Тяхепильд Л. Я. Вopr. мед. химии, т. 8, с. 264, 1962.
8. Арутюнян А. В., Микаелян Э. М. Вopr. биохимии мозга, т. 1, с. 113—116, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1964.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вopr. мед. химии, т. 5, № 8, с. 538—544, 1962.
10. Richter D., Dawson R. M. C. J. Biol. Chem., v. 176, p. 1199, 1948.
11. Takagaki G. J. Biochim., v. 42, № 2, p. 131, 1955.
12. Кометиани П. А. Вopr. биохимии мозга, т. 3, с. 243—253, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1967.
13. Кометиани П. А. Биохимия, т. 35, № 2, с. 394—403, 1970.
14. Гаевская М. С., Носова Е. А., Слез Л. М. Укр. биохим. журн., т. 37, № 5, с. 691—696, 1965.
15. Папаян А. А. Журн. эксперим. и клин. мед., т. 14, № 5, с. 28—32, 1974.
16. Le Baron F. N., Rothleder E. E.—In: Biochemistry of lipids, v. 1, Pergamon Press Oxford, 1960.
17. Ledig M., Mandell P. J. Neurochem, v. 11, № 3, p. 210—211, 1961.
18. Mandel P., Ledig M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 24, p. 275, 1966.
19. Воронова Н. В. Сообщ. АН ГССР, т. 73, № 2, с. 469—472, 1974.
20. Кометиани П. А., Эдигашвили Л. А., Микеладзе Д. Г. Вopr. биохимии, мозга, т. 13, с. 158—167, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
21. Muller Th., Rathlev T., Kesselberg Th. Biochim. et biophys. acta, v. 19, p. 563, 1956.

Поступила 16. VII 1986