

РОЛЬ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

β - and α -adrenergic receptor participated in relation of the glutamate dehydrogenase activity.

До настоящего времени не выяснены пути взаимодействия биогенных аминов на один из основных ферментов азотистого и энергетического метаболизма – глутаматдегидрогеназу (ГДГ, КФ 1.4.1.3.). Ранее было показано, что в условиях хирургической адреналэктомии и при изменении функции надпочечников большими дозами кортизол-ацетата и адреналина обнаружено изменение скорости окислительного дезаминирования глутамата и восстановительного аминирования α -ОГЛ [1]. Однако в литературе практически отсутствуют сведения о возможном участии α - и β -адренергических структур в регуляции активности ГДГ. К настоящему времени получены многочисленные данные о том, что активаторы адренергической системы стимулируют процессы энергетического обмена [2], влияют на метаболизм кетокилот [3], ускоряют глюконеогенез [4], гликогенолиз [4], что, несомненно, должно сказаться на активности ГДГ, стоящей на стыке углеводного и азотистого метаболизма и играющей большую роль в регуляции энергетического обмена.

Целью настоящего исследования явилось изучение скорости синтеза и дезаминирования глутаминовой кислоты (ГК), катализируемых ГДГ в печени крыс после введения активаторов и блокаторов адренорецепторов.

Материал и методика

Опыты проведены на беспородных белых крысах массой 130–180 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Исследуемые адренергические препараты вводили по следующей схеме:

первой группе животных – активаторы α - и β -адренорецепторов: адреналин, норадреналин, изопротеренол в дозе 2 мкг/100г;

второй группе животных – блокаторы α - и β -адренорецепторов: фентоламин в дозе 1,25 мг/100г; пропранолол – 200 мкг/100г;

третью группу составили животные, которым адrenomиметические вещества вводили через 20 мин после адреноблокаторов.

Дозы вводимых препаратов были подобраны на основании данных литературы [5]. Контролем служили животные, которым в таком же объеме вводили 0,9% NaCl. Активность аминирующей и дезаминирующей ГДГ определяли в митохондриях печени крыс по методикам, описанным ранее [6], рассчитывали на 1 мг белка, количество которого определяли по Лоури [7]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что в условиях *in vivo* катехоламины оказывают свое влияние на активность ГДГ. Как видно из таблицы, внутрибрюшинное введение адреналина, специфично взаимодействующего не только с β -, но и с α -адренорецепторами клетки, приводит к достоверному повышению активности дезаминирующей и аминирующей ГДГ на 24% и 19% соответственно. Изопротеренол, синтетический катехоламин, вызывающий избирательную активацию β -адренорецепторов, активировал процесс восстановительного аминирования α -ОГЛ. Норадреналин также вызывал активацию как скорости синтеза, так и дезаминирования ГК в печени крыс.

Полученные нами данные по активации глутаматдегидрогеназной активности катехоламинами согласуются с исследованиями [8], показавшими, что адреналин в малых концентрациях стимулирует активность ферментов, принимающих участие в процессах дезаминирования L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот, что сопровождается усилением глюконеогенеза упомянутых аминокислот.

Известно, что катехоламины регулируют физиологическую активность клеточных мишеней, запуская цепь реакций, протекающих в мембраносвязанной аде-

нилатциклазной системе [9]. Функции митохондрий регулируются катехоламинами через основные внутриклеточные механизмы: повышение содержания ц-АМФ путем стимулирования активности аденилатциклазы через β -адренорецепторы и изменение концентрации ионов Ca^{2+} . Оба механизма могут быть взаимозаменяемыми или последовательными [9]. С одной стороны, ц-АМФ и Ca^{2+} действуют как аллостерические эффекторы, активируя ц-АМФ, зависимую протеинкиназу и кальмодулин соответственно. С другой стороны, установлено, что фосфорные эфиры аденозина (ц-АМФ, АДФ) являются положительными модуляторами ГДГ и помимо активирующего эффекта обладают способностью изменять соотношение реакций синтеза и распада ГК, катализируемых ГДГ [10]. Кроме того, имеются сведения о том, что в механизме усиления дезаминирования L-ГК под действием катехоламинов важную роль играет ускорение протеинкиназной реакции, приводящей к усилению фосфорилирования соответствующих белков, в том числе и ферментов, вовлекающихся в процессы дезаминирования аминокислот [8]. Учитывая, что ГДГ является фосфопротеином и активность ее регулируется путем фосфорилирования и дефосфорилирования [8], можно предположить, что повышение активности ГДГ в митохондриях печени при введении катехоламинов связано с увеличением уровня ц-АМФ, вовлечением протеинкиназной реакции и усилением фосфорилирования ГДГ. Нельзя не учитывать и тот факт, что адреналин существенно повышает концентрацию НАДН и НАДФ, что, несомненно, сказывается на увеличении скорости восстановительного аминирования α -ОГЛ. Также следует принять во внимание, что катехоламины, интенсифицируя окисление α -ОГЛ, сукцината, вызывают повышение концентрации внутримитохондриального Ca^{2+} , активирующая роль которого показана для ГДГ.

Активность НАД⁺- и НАДН-ГДГ в печени белых крыс при введении катехоламинов и адреноблокаторов (нмоль НАД/мг белка/мин)

Серии опытов	НАД ⁺ -ГДГ	НАДН-ГДГ
Контроль 1 (0,9% NaCl)	216,0 ± 4,9	569,1 ± 8,3
Адреналин	267,8 ± 3,9*	677,2 ± 16,5*
Изопротеренол	231,1 ± 1,6*	512,2 ± 9,6*
Пропранолол	178,0 ± 5,1*	504,0 ± 10,7*
Норадреналин	207,5 ± 3,2	670,0 ± 8,7*
Фентоламин	236,1 ± 6,9*	687,1 ± 10,2*
Фентоламин + пропранолол	190,0 ± 2,3*	449,5 ± 10,1*
Контроль 2 (0,9% NaCl + 0,9% NaCl)	190,0 ± 2,2	510,0 ± 2,3
Пропранолол + адреналин	186,2 ± 1,4	408,1 ± 3,5*
Пропранолол + изопротеренол	174,9 ± 4,6*	350,2 ± 8,4*
Фентоламин + норадреналин	193,2 ± 4,6	409,2 ± 18,9*
Фентоламин + пропранолол + адреналин	192,1 ± 4,8	250,2 ± 7,9*

Примечание: * – достоверные изменения при $p < 0,05$

торов предотвращала действие изопротеренола на дезаминирующую ГДГ печени, но практически не изменяла эффекта блокатора по отношению к НАДН-ГДГ. Совместное введение адреналина и пропранолола вызывало снятие активирующего действия адреналина на аминирующую и дезаминирующую ГДГ в печени. На фоне совместной блокады α - и β -адренорецепторов адреналин не проявлял присущего ему активирующего действия. Полученные результаты согласуются с данными в литературе о том, что пропранолол предотвращает избыточную стимуляцию β -адренорецепторов катехоламинами, при которой значительно повышается уровень ц-АМФ, что закономерно активирует липазы, фосфолипазы, усиливает процессы перекисного окисления липидов и нарушает функционирование липидзависимых ферментов, рецепторов и каналов ионной проницаемости [11]. Изложенные выше данные позволяют предположить участие β -адренорецепторов в опосредовании влияния катехоламинов на активность НАД⁺ и НАДН-ГДГ в печени крыс.

Влияние антагонистов адренорецепторов по сравнению с катехоламинами имело определенные особенности. Введение пропранолола, блокирующего β -адренорецепторы, вызывало снижение как скорости восстановительного аминирования α -ОГЛ, так и окислительного дезаминирования L-ГК (см. таблицу). Данные эффекты связаны с тем, что пропранолол, угнетая сопряженную с β -адренорецепторами аденилатциклазу, приводит к снижению уровня ц-АМФ и процессов энергообразования [11]. Блокада β -рецеп-

В связи с тем, что в печени крыс содержатся как β -, так и α -адренорецепторы, представляло интерес изучить активность аминирующей и дезаминирующей ГДГ после введения агонистов и антагонистов α -адренорецепторов. Из таблицы видно, что норадреналин вызывал достоверную активацию процесса восстановительного аминирования α -ОГЛ. Блокада α -рецепторов фентоламином способствовала возрастанию аминирующей и дезаминирующей глутаматдегидрогеназной активности. Изменение функционального состояния α -адренорецепторов значительно сказывалось на активности НАДН-ГДГ. Необходимо отметить, что интенсивность процесса восстановительного аминирования α -ОГЛ в митохондриях была выше при введении фентоламина, чем норадреналина. Фентоламин, взаимодействуя с пресинаптическими α -адренорецепторами, вызывает выброс норадреналина из нервных окончаний, а также адреналина из мозгового слоя надпочечников [12]. Следовательно, изменение активности ГДГ при введении фентоламина, вероятно, обусловлено изменением уровня катехоламинов в организме.

При совместном введении агониста и антагониста α -рецепторов наблюдалось снятие активирующего действия норадреналина на аминирующую ГДГ и возвращение активности дезаминирующей ГДГ к контрольному уровню. Полученные данные позволяют предположить участие α -адренорецепторов в опосредовании действия норадреналина на активность ГДГ. В α -эффектах ц-АМФ не участвует, реализация этих эффектов связана со стимуляцией круговорота фосфоинозитидов и высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных запасов [4,13].

Для более полного ответа на вопрос об участии адренорецепторов в регуляции ГДГ были проведены эксперименты с одновременным введением блокаторов как α -, так и β -рецепторов. Совместное введение фентоламина и пропранолола оказывало на ГДГ действие, аналогичное действию одного β -блокатора (см.таблицу). Если инъекция адреналина вызывала повышение как скорости синтеза, так и дезаминирования Л-ГК, то на фоне совместного введения фентоламина и пропранолола адреналин не проявил присущего ему активирующего действия. Активность дезаминирующей ГДГ снизилась практически до уровня контрольных величин, а аминирующей ГДГ уменьшилась на 51%.

Следует отметить, что некоторые эффекты адренергических препаратов не укладывались в рамки теории адренорецепции. Необходимо учитывать, что адренергические вещества обладают и немедиаторными эффектами. Катехоламины, не связавшиеся с рецепторами, могут проникать как в цитоплазму, так и в ядра клеток печени и головного мозга [14], могут влиять на биоэнергетику митохондрий [2], связываться с нереперторными белками и SH-группами ферментов [15]. Нельзя исключить и прямого действия адренергических препаратов на митохондриальные мембраны. Пропранолол способен связываться с фосфолипидами митохондрий, образуя ароматическим фрагментом связь с гидрофобными областями мембран, норадреналин – с моноаминооксидазой наружной мембраны митохондрий [16]. В работе [5] показано также, что при введении изучаемых препаратов происходит перераспределение митохондриального изофермента аспартатаминотрансферазы – одного из ферментов обмена ГК – между митохондриями и цитоплазмой, свидетельствующее об изменении проницаемости мембран. Катехоламины могут изменять свойства и внутренней мембраны митохондрий [17], стимулируя через β -рецепторы ц-АМФ-зависимым путем трансдегидрогеназу – интегральный белок внутренней мембраны. ГДГ обладает способностью специфически взаимодействовать с внутренней митохондриальной мембраной, вследствие чего изменяются кинетические характеристики фермента [18]. Поэтому одним из факторов, опосредующих изменение активности ГДГ при регуляции катехоламинами, может являться внутренняя мембрана митохондрий. Ранее получены данные в пользу существенной роли внутренней мембраны в механизме активации НАД-изоцитратдегидрогеназы катехоламинами, глутаминазы – глюкагоном [9].

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, подтверждают возможность регуляции активности аминирующей и дезаминирующей

ГДГ в печени крыс через α - и β -адренорецепторы, а также немедиаторным путем.

1. Черкасова Л. С., Пикулев А. Т. Метаболические сдвиги в митохондриях облученного организма, связанные с циклом трикарбоновых кислот. Мн., 1977
2. Саакян И. Р., Камалян Р. Г. // Тез. докл. Всесоюз. биохим. съезда. М., 1986. Т.3. С.62
3. Ochs R. // I. Biol Chem. 1984. Vol.259. № 21. P 13004.
4. Jorek M. // Biochem. et biophys. acta. 1982. Vol.632. №4. P.517.
5. Шолух М. В., Пикулев А. Т. // Вопр. мед. химии. 1976. Т.22. №4. С.482.
6. Пикулев А. Т., Зырянова Т. Н. // Радиобиология. 1984. Т.24. №1. С.29
7. Lowry O. H. // J. Biol. Chem. 1951. Vol.193. P 265.
8. Оганесян А. С. // Биол. журн. Армении. 1982. №5. С.497.
9. Taussig R., Gilman A. // J. Biol. Chem. 1995. Vol.270. №1. P1
10. Gonzalez M. P. // Clenc. biol. 1981. Vol.6. №2. P 151.
11. Девяткина Т. А. // Вопр. мед. химии. 1990. Т.36. №4. С.78.
12. Комиссаров И. В. // Фармакол. и токсикол. 1980. №2. С.230.
13. Lepretre N., Mironnean I. // J. Pharmacol. and Exp. Ther. 1994. Vol.68. №1. P.167
14. Божко Г. Х., Краева В. С. // ДАН УССР. 1983. №9. С.58.
15. Shaw L. // Biochem. Pharmacol. 1987. Vol.36. №14. P 2283.
16. Williams S. // Mol. and Cell Biochem. 1995. Vol.149. P 217.
17. Медведев А. Е. // Вопр. мед. химии. 1994. Т.40. №1. С.7.
18. Pong-Rahimi F. // Int. J. Biochem. 1987. Vol.19. №1. P 53.
19. Медведев А. Е., Труфанова Л. В. // Вопр. мед. химии. 1994. Т.40. №4 С.11.

Поступила в редакцию 10.12.98.

УДК 581.2.02

С.Н. ЕПИМАШКО, В.М. ЮРИН

ДЕЙСТВИЕ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ НА АКТИВНОСТЬ АТФ-азы И ПИРОФОСФАТАЗЫ ТОНОПЛАСТА

The effects of 3 triazine herbicides (atrazine, prometryne, simazine) on ATP- and PPi- dependent proton gradient development and ATP-hydrolysing activity by tonoplast-enriched vesicles isolated from leaves of *Nicotiana tabacum* plants were investigated. All triazine disrupted proton gradient formation across vesicles in both cases (ATP- and PPi-dependent) at the concentration higher than 0,1 mM. Half-maximal inhibition concentration (I_{50}) for these compounds were evaluated. However, triazine did not affect significantly the ATP-hydrolysing activity by tonoplast vesicles at any concentration tested (0,02 – 1 mM). We suggest that triazine herbicides inhibited tonoplast proton pumps indirectly by increasing passive proton leakage across membrane vesicles.

Симметричные триазины являются эффективными блокаторами транспорта электронов фотосистемы II мембран тилакоидов и широко применяются в современном сельском хозяйстве как селективные гербициды для борьбы с двудольными сорняками [1]. Однако все чаще появляются научные сообщения о способности соединений триазинового ряда ингибировать транспорт аминокислот, сульфатов, калия как у чувствительных, так и устойчивых к ним растений [2–4]. Такой эффект может быть обусловлен либо прямым воздействием сим-триазинов на транспортные белки или (и) структуру мембран, либо ингибированием протонных помп плазмалеммы и тонопласта, которые создают движущую силу в виде протонного градиента для ряда транспортных систем на клеточных мембранах. Большинство существующих методик, тест-объектами которых являются ткани или целые растительные клетки, не позволяют однозначно решить этот вопрос, поскольку действие гербицидов в этом случае может быть опосредовано через нарушение процессов синтеза АТФ, мембранных белков и липидов. Тем более, что триазины легко проникают путем пассивной диффузии через клеточные мембраны и быстро достигают концентрационного равновесия с внешней средой [5, 6]. В этой связи уникальную возможность для изучения воздействия различных ксенобиотиков, в том числе и гербицидов, на функционирование протонных помп различных мембран клеток растений предоставляет техника получения мембранных везикул, способных поддерживать градиент ионов водорода, сформированный протонными помпами [7].

В настоящей работе было исследовано действие трех сим-триазиновых гербицидов в широком диапазоне концентраций на активный транспорт прото-