

Л. А. АРУТЮНЯН, А. С. ОГАНЕСЯН

ОБРАЗОВАНИЕ АММИАКА В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Деаминирование L-аминокислот является одним из важных путей их обмена. Выяснению механизма деаминирования природных аминокислот посвящены работы многих исследователей. Однако до настоящего времени нет единого мнения в отношении механизма, объясняющего этот процесс.

На основании своих исследований Браунштейн [1] развил представление о том, что аминокислоты многих L-аминокислот превращаются в свободный аммиак не прямым путем, а через трансаминирование с α -кетоглутаровой кислотой, с последующим деаминированием образовавшейся глутаминовой кислоты. Однако целый ряд последующих исследований показал, что глутаматдегидрогеназной реакцией образуется незначительное количество свободного аммиака. Равновесие действия этого фермента смещено в сторону синтеза глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой кислоты и аммиака [9, 12].

Исследования, проведенные в последнее время в Институте биохимии АН АрмССР [3, 4], выявили весьма интересную особенность течения процессов обмена природных аминокислот, в частности их деаминирования, в почечной ткани белых крыс. Исследования показали, что срезы коркового слоя почек белых крыс в аэробных условиях деаминируют целый ряд природных аминокислот (глутаминовая и аспарагиновая кислоты, орнитин, аргинин, γ -аминомасляная кислота, лизин, гистидин и др.), из коих наиболее интенсивно глутаминовую, аспарагиновую кислоты и орнитин. Установлено, что L-аспарагиновая кислота и L-орнитин деаминируются без предварительного превращения в глутаминовую кислоту. Полученные данные дали авторам основание высказать мнение о том, что в коре почек белых крыс имеются отдельные системы, осуществляющие деаминирование L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и L-орнитина. В связи с этим представляет интерес изучение процесса аммиакообразования в почках различных животных в филогенетическом аспекте с целью выявления особенностей аминокислотного обмена в почечной ткани различных представителей животного мира.

Опыты проводили со срезами коркового и мозгового слоев (в отдельности) почек некоторых млекопитающих (кролик, морская свинка,

бык, свинья, овца, белая крыса), птиц (курица*) и земноводных (лягушка*). Изучали образование аммиака из некоторых L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, орнитин, аргинин, цитруллин, пролин, α -аланин), а также из глутамина, адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) и НАД. Срезы почек весом 200 мг инкубировали в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере при 37°C в течение одного часа (в отдельных опытах инкубацию ткани продолжали до 3-х час.) в атмосфере кислорода—95 и углекислого газа—5%. На каждую пробу добавляли в мкмоль: аминокислоты—16, адениннуклеотиды—10, НАД—2,86, НА—8,2. Аммиак в инкубируемой среде определяли микродиффузионным методом по Конве.

Таблица 1

Образование аммиака из L-аминокислот срезами коркового слоя почек различных животных (прирост аммиака в мкмоль/г ткани/час)

Вид животного	Глутаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин	Аргинин	Цитруллин	Пролин	L-аланин
Лягушка	1,3±0,4 (5)	4,2±0,3 (6)	0,8±0,2 (4)	1,0±0,1 (2)	1,5±0,5 (4)	0 (3)	0,9±0,3 (3)
Курица	1,5±0,2 (6)	4,6±0,4 (6)	1,9±0,06 (6)	1,2±0,1 (4)	-2,1±0,3 (4)	-1,8±0,3 (4)	3,1±0,3 (5)
Кролик	-0,7±0,2 (4)	0 (4)	1,1±0,2 (4)	-0,6 (4)	-0,6 (4)	-0,5±0,1 (4)	-0,6 (4)
Морская свинка	-0,3±0,06 (3)	0 (3)	0,8 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Бык	0 (4)	2,3±0,2 (4)	0,9±0,06 (4)	1,0±0,1 (3)	0,3 (3)	0 (3)	1,4±0,3 (4)
Свинья	0 (2)	1,7±0,1 (2)	0,8±0,2 (2)	-0,3 (2)	-0,3 (2)	0 (2)	1,3±0,1 (2)
Овца	0 (1)	1,9 (1)	1,9 (1)	0,4 (1)	-1,5 (1)	0,4 (1)	0,8 (1)
Белая крыса	6,5±0,6 (12)	9,7±0,8 (13)	12,0±1,0 (12)	5,2±0,6 (5)	-1,1±0,1 (10)	5,0±0,9 (5)	1,5±0,2 (6)

Содержание аммиака в инкубированных контролях:

лягушка—3,5±0,1, курица—8,7±0,3, кролик—1,8±0,1, морская свинка—0,9±0,06, бык—2,7±0,1, свинья—2,5±0,1, овца—3,1, белая крыса—9,7±0,6.

Результаты исследований (табл. 1) показывают, что почки белых крыс (корковый слой) по способности деаминировать L-аминокислоты резко отличаются от почек остальных изученных нами животных. Срезы коркового слоя почек белых крыс способны продуцировать из ряда L-аминокислот большое количество свободного аммиака. Это отмечается особенно в отношении глутаминовой, аспарагиновой кислот и орнитина. Между тем срезы почек остальных изученных нами животных намного уступают таковым белых крыс; у них отмечается выход небольшого количества свободного аммиака из отдельных L-аминокислот. Если исклю-

* В связи с тем, что в почках лягушек и кур невозможно отделить корковый слой от мозгового, в опытах с этими животными использовали срезы целых почек.

чить белых крыс, то среди остальных животных деаминирование аминокислот в сравнительно ощутимой мере протекает в срезах почек лягушек и кур. Результаты исследований показали, что сравнительное увеличение продукции свободного аммиака у большинства животных (лягушка, курица, бык, овца, свинья) наблюдается из аспарагиновой кислоты. Из α -аланина выход достаточного количества аммиака наблюдается у кур. По сравнению с этими аминокислотами орнитин дает меньший прирост аммиака. При добавлении глутаминовой кислоты выход аммиака наблюдается в срезах почек лягушек и кур; в срезах же млекопитающих она либо не дает прироста аммиака (бык, овца, свинья), либо подавляет его образование (кролик, морская свинка). Образование небольшого количества аммиака из аргинина наблюдается в срезах почек лягушек, кур и быка; цитруллин, который у кур, овец и белых крыс подавляет образование аммиака, у лягушек слегка стимулирует этот процесс, а у остальных животных не оказывает особого влияния на аммиакообразование. Из пролина отмечается выход аммиака только в срезах коры почек белых крыс, у остальных животных эта аминокислота почти не оказывает влияния на процессы аммиакообразования, если не считать небольшого подавляющего действия у кур.

В срезах мозгового слоя почек всех изученных нами животных ни одна из вышеупомянутых аминокислот не дает прироста аммиака, за исключением срезов мозгового слоя почек белых крыс, у которых наблюдается небольшой выход аммиака из орнитина.

Как видно из вышеприведенных данных, более интенсивное образование аммиака из L-аминокислот наблюдается только в срезах коркового слоя почек белых крыс. У остальных животных отмечается небольшой прирост аммиака из отдельных аминокислот (а иногда и это отсутствует).

Надо полагать, что в почках этих животных активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот, низкая, поэтому и выход аммиака из упомянутых аминокислот незначительный. Для выяснения этого вопроса мы несколько изменили условия опыта. С одной стороны, продлили продолжительность инкубации (до 3-х час.), а с другой—увеличили количество добавленных аминокислот (опыты проводили на срезах коры почек кролика). Результаты этих опытов приведены в табл. 2. Как видно из этой таблицы, при трехкратном увеличении количества субстрата (48 мкмоль) несколько увеличивается образование аммиака только из орнитина, из аспарагиновой кислоты выхода аммиака не наблюдается, а глутаминовая кислота, наоборот, вызывает понижение количества образовавшегося аммиака. Однако при удлинении времени инкубации (3 часа) отмечается заметное увеличение количества свободного аммиака как из аспарагиновой кислоты, так и особенно из орнитина. Таким образом, результаты этих опытов показывают, что как удлинение времени инкубации, так и увеличение количества добавленных кислот приводит к значительному усилению аммиакообразования из L-аминокислот.

Отдельной серией опытов изучали процессы образования аммиака из глутамина, адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) и НАД. По литературным данным, основным источником аммиака мочи является глутамин, а адениловой кислоте [5, 6] и НАД—[2, 7] придается большое значение в процессах образования аммиака из L-аминокислот, в частности, из L-аспарагиновой кислоты.

Таблица 2

Образование аммиака из L-аминокислот срезами коры почек кролика
в зависимости от условий опытов

(прирост аммиака в мкмоль/г ткани/час, три часа)

Средние данные 5 опытов

Количество добав- ленных аминокис- лот	Длительность инкубации	Глутаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин
16 мкмоль	1 час	$-0,9 \pm 0,1$	0	$1,0 \pm 0,2$
48 мкмоль	1 час	$-0,9 \pm 0,1$	0	$2,2 \pm 0,2$
16 мкмоль	3 часа	$-1,3 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,5$
48 мкмоль	3 часа	$-1,4 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,2$

Количество аммиака в инкубированных контролях:

при инкубации в течение 1 час. $1,9 \pm 0,2$,

при инкубации в течение 3 час. $2,8 \pm 0,3$.

Результаты опытов, приведенные в табл. 3, показывают, что срезы почек всех изученных нами животных интенсивно деаминируют глутамин; это особенно проявляется в срезах почек белых крыс. Среди остальных животных наибольшее количество аммиака из глутамина продуцируют срезы почек курицы, затем коркового слоя почек кролика, лягушки, овцы, быка, свиньи и морских свинок. Срезы мозгового слоя почек всех животных, как правило, деаминируют глутамин слабее, чем срезы коркового слоя, за исключением почек морских свинок, у которых срезы мозгового слоя из глутамина продуцируют больше аммиака, чем срезы коркового слоя. Как показывают данные табл. 3, в почках всех животных довольно интенсивно деаминируются также адениннуклеотиды и в меньшей степени—НАД. Адениннуклеотиды у отдельных животных дают выход почти одинакового количества аммиака, исключение составляют морские свинки, у которых в корковом слое почек выход аммиака из АМФ меньше по сравнению с АТФ и АДФ. Активность ферментов, осуществляющих деаминирование этих нуклеотидов, в корковом слое выше по сравнению с таковой мозгового слоя. Подобная закономерность наблюдается и в отношении НАД.

Приведенные данные показывают, что в почках различных представителей животного мира образование аммиака из L-аминокислот имеет различную картину.

Среди всех животных, изученных нами, особое место занимают белые крысы, у которых срезы коркового слоя почек проявляют очень вы-

Таблица 3

Образование аммиака из глутамина, адениннуклеотидов и НАД срезами почек различных животных (прирост аммиака в мкмоль/г ткани/час)

Вид животного		Глутамин	АТФ	АДФ	АМФ	НАД+НА*
Лягушка		$10,5 \pm 1,3$ (2)	$15,2 \pm 0,6$ (3)	$13,8 \pm 0,9$ (3)	$15,3 \pm 1,1$ (3)	$3,3 \pm 0,7$ (3)
Курица		$16,2 \pm 0,3$ (3)	$16,7 \pm 0,1$ (8)	$15,3 \pm 0,4$ (8)	$15,6 \pm 0,4$ (8)	$17,6 \pm 0,6$ (6)
Кролик	корковый слой	$13,2 \pm 0,2$ (4)	$14,2 \pm 0,7$ (4)	$12,2 \pm 0,8$ (4)	$12,7 \pm 0,5$ (4)	$2,8 \pm 0,3$ (4)
	мозговой слой	$6,3 \pm 0,06$ (3)	$8,8 \pm 0,8$ (4)	$7,7 \pm 1,2$ (3)	$6,6 \pm 0,6$ (3)	$3,1 \pm 0,06$ (3)
Морская свинка	корковый слой	$3,3 \pm 0,4$ (4)	$14,7 \pm 0,5$ (3)	$14,9 \pm 0,5$ (4)	$10,6 \pm 0,4$ (4)	$1,6 \pm 0,2$ (4)
	мозговой слой	$6,6 \pm 0,2$ (3)	$12,2 \pm 0,1$ (3)	$10,9 \pm 0,3$ (3)	$9,5 \pm 0,1$ (3)	$2,1 \pm 0,1$ (3)
Бык	корковый слой	$8,6 \pm 0,3$ (4)			$10,6 \pm 0,2$ (4)	$2,7 \pm 0,3$ (4)
	мозговой слой	$6,2 \pm 0,1$ (4)			$9,6 \pm 0,2$ (4)	$2,1 \pm 0,2$ (2)
Свинья	корковый слой	$6,1 \pm 0,3$ (2)			$10,6 \pm 0,4$ (2)	$2,7 \pm 0,3$ (2)
	мозговой слой	$3,1 \pm 0,3$ (2)			$9,0 \pm 0,7$ (2)	$2,3 \pm 0,3$ (2)
Овца	корковый слой	$11,2$ (1)			$13,2$ (1)	$3,5$ (1)
	мозговой слой	$7,0$ (1)			$8,5$ (1)	$2,0$ (1)
Белая крыса	корковый слой	$37,4 \pm 4,7$ (6)	$13,6 \pm 1,5$ (3)	$13,6 \pm 0,9$ (5)	$12,0 \pm 1,2$ (4)	$4,5 \pm 0,5$ (6)
	мозговой слой	$21,3 \pm 2,6$ (3)	$12,0 \pm 1,6$ (4)	$11,2 \pm 1,0$ (4)	$12,0 \pm 0,6$ (4)	$1,1 \pm 0,2$ (3)

Содержание аммиака в инкубированных контролях

	Лягушка	Курица	Кролик	Морская свинка	Бык	Свинья	Овца	Белая крыса
Корковый слой	$3,5 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,06$	$2,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	3,1	$9,7 \pm 0,6$
Мозговой слой			$2,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	2,0	$6,5 \pm 0,7$

* НА добавляли для ингибирования нуклеозидазного расщепления НАД.

сокую деаминазную активность в отношении некоторых L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая кислоты, орнитин и др.). В этом отношении результаты наших исследований согласуются с данными других авторов [3, 4, 8]. У всех остальных животных активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот, очень низкая. У некоторых животных (морские свинки) даже при длительной инкубации не отмечается аммиакообразования из аспарагиновой кислоты, а глутаминовая кислота у кроликов и морских свинок вызывает понижение количества свободного аммиака по сравнению с инкубированным контролем,

что объясняется синтезом глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака. Интересно отметить, что у всех животных при добавлении орнитина наблюдается прирост ощутимого количества аммиака. Это отмечается даже в тех случаях, когда глутаминовая и аспарагиновая кислоты не дают выхода свободного аммиака. Результаты этих опытов показывают, что орнитин подвергается деаминированию, предварительно не превращаясь в глутаминовую или аспарагиновую кислоты. Этот факт, представляющий большой научный интерес, показывает наличие отдельной ферментной системы, осуществляющей деаминирование L-орнитина в почечной ткани животных.

Опыты с увеличением количества добавленных аминокислот и с удлинением продолжительности инкубации показывают, что срезы почек кроликов обладают способностью деаминировать кроме L-орнитина, и L-аспарагиновую кислоту. Однако это свойство не проявляется при часовой инкубации в связи с низкой активностью фермента, осуществляющего деаминирование аспарагиновой кислоты. Увеличением количества добавленных аминокислот и удлинением продолжительности инкубации создаются благоприятные условия для действия ферментов на соответствующие субстраты, в результате чего и возрастает количество образовавшегося аммиака как из L-аспарагиновой кислоты, так и из L-орнитина. Что касается L-глутаминовой кислоты, то и в этих опытах наблюдается торможение образования свободного аммиака, что связано с усилением синтеза глутамина за счет аммиака, образовавшегося из других источников.

В почечной ткани различных животных глутамин дает наибольшее количество свободного аммиака, что связано с высокой активностью глутаминазы 1. Это особенно выражено у белых крыс. Среди остальных животных высокой глутаминазной активностью обладают почки кур, кроликов, затем лягушек, быка, овцы, свиньи и морских свинок. Интересно отметить, что в отличие от остальных животных, у которых глутаминазная активность в корковом слое почек выше, чем в мозговом, у морских свинок, наоборот, в мозговом слое активность этого фермента в два раза превосходит глутаминазную активность коркового слоя. Подобная локализация глутаминазы в почках морских свинок, по-видимому, связана с особенностями анатомической структуры почек этих животных.

Результаты наших исследований также показывают, что в почках всех животных с довольно высокой скоростью протекают процессы образования аммиака из адениннуклеотидов и НАД. Эти вещества представляют интерес с точки зрения их участия в процессах деаминирования L-аминокислот. По литературным данным, как адениловая кислота [5, 6], так и НАД [2, 7] принимают участие в образовании свободного аммиака из L-аспарагиновой кислоты. В животных тканях многие L-аминокислоты путем трансаминирования с α -кетоглутаровой кислотой превращаются в L-глутаминовую кислоту, а последняя—в аспарагиновую. Аспарагиновая кислота, как известно, принимает участие и в син-

тезе мочевины [10, 11]. Результаты исследований показывают, что у млекопитающих, у которых конечным продуктом обмена аминокислот является мочевина, из L-аминокислот аммиак или не образуется, или образуется в небольшом количестве. Исключение составляют белые крысы, у которых этот процесс (аммиакообразование) протекает с высокой скоростью в корковом слое почек. Надо полагать, что у белых крыс довольно интенсивно протекают процессы и аммиакообразования, и синтеза мочевины, а у остальных млекопитающих аминокислот L-аминокислот преимущественно выводится из организма путем синтеза мочевины. Каков удельный вес процессов образования аммиака и синтеза мочевины в почках указанных животных покажут дальнейшие исследования.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 10.VIII 1969 г.

Լ. Ա. ԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԱՄԻԱԿԻ ԱՌԱՋԱՅՈՒՄԸ ՏԱՐՔԵՐ ՏԵՍԱԿԻ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄԱՅԻՆ ՀՅՈՒՄԱԿԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո մ

Փորձերը դրվել են էվոլյուցիոն սանդուղքի տարբեր աստիճանների վրա՝ կանգնած կենդանիների երկամյների կտրվածքների հետ (գորտ, հավ, ճագար, ծովախոզուկ, խոշոր եղջերավոր կենդանիներ, խոզ, ոչխար և սպիտակ առնետ)։ Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ ամիակի առաջացումը մի շարք L-ամինաթթուներից (գլյուտամինաթթու, ասպարագինաթթու, օրնիտին, արգինին, պրուլին, գլյուտամին և այլն) և նուկլեոտիդներից (ԱՏՖ, ԱԴՖ, ԱՄՖ, ՆԱԴ) տարբեր կենդանիների մոտ արտահայտված է տարբեր ինտենսիվությամբ։ Սպիտակ առնետների մոտ վերոհիշյալ աղբյուրներից առաջանում է բավական մեծ քանակությամբ ազատ ամիակ։ Մինչդեռ մնացած կենդանիների մոտ այդ պրոցեսներն արտահայտված են կամ թույլ չափով, կամ բացակայում են։

Փորձերը ցույց են տվել, որ համարյա բոլոր կենդանիների մոտ այս կամ այն չափով դեամինացվում է L-օրնիտինը։ Գլյուտամինաթթուն ճագարների և ծովախոզուկների մոտ նվազեցնում է ազատ ամիակի քանակությունը, որ բացատրվում է գլյուտամինի սինթեզով, իսկ գորտերի և հավերի մոտ թեթևակի բարձրանում է ազատ ամիակի քանակը։ Ասպարագինաթթուն բավարարչափով դեամինացվում է գորտերի և հավերի մոտ, իսկ ոչխարների, խոզերի և խոշոր եղջերավոր անասունների մոտ այդ երևույթը արտահայտված է թեթևակի։ Հիշյալ աղբյուրներից ամիակագոյացման ցածր աստիճանը որոշ կենդանիների մոտ բացատրվում է համապատասխան ֆերմենտների ցածր ակտիվությամբ։ Բոլոր կենդանիների մոտ ամենամեծ քանակով ամիակ ստացվում է գլյուտամինից, որը խիստ արտահայտված է սպիտակ առնետների մոտ։ Երկամյներում որոշ չափով ամիակի աղբյուր կարող են լինել նաև ադենինուկլեոտիդները (ԱՏՖ, ԱԴՖ, ԱՄՖ) և ՆԱԴ-ը։

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Браунштейн А. Е., Крицман М. Г. Биохимия, 2, 242, 1937.
2. Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г. Вопросы биохимии мозга, 2, 5, 1966.
3. Бунятян Г. Х., Оганесян А. С., Геворкян Ж. С. ДАН СССР, 177, 951, 1967.
4. Геворкян Ж. С. Автореф. канд. дисс., 1969.
5. Кометиани П. А. Биохимия, 24, 729, 1959.
6. Кометиани П. А. В кн.: Обмен аминокислот, 99, 1967.
7. Мовсесян С. Г., Манасян Р. Ф. Вопросы биохимии мозга, 3, 53, 1967.
8. Krebs H. A. Biochem. J., 29, 1620, 1935.
9. Olson J. A., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 202, 841, 1953.
10. Ratner S., Petrack B. J. Biol. Chem., 191, 693, 1951.
11. Ratner S., Petrack B. J. Biol. Chem., 200, 161, 1953.
12. Strecker H. J. Arch. Biochem. Biophys., 46, 128, 1953.