

О ПРИРОДЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТКИ  
 КРОВИ НА ПРОЦЕССЫ ДЕАМИНИРОВАНИЯ  
 L-АМИНОКИСЛОТ В КОРКОВОМ СЛОЕ ПОЧЕК  
 БЕЛЫХ КРЫС

Ж. С. ГЕВОРКЯН, А. С. ОГАНЕСЯН

Результаты исследований показали, что сыворотка крови в значительной мере подавляет деаминацию некоторых L-аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой и орнитина). Это явление обратимое и имеет важное биологическое значение для регуляции указанного процесса в зависимости от физиологического состояния живого организма.

*Ключевые слова:* корковый слой почек, деаминация L-аминокислот.

Аммиак мочи почти полностью образуется в почках. Его количество зависит от активности ферментов, вовлекающихся в процессы деаминации глутамина и деаминации ряда аминокислот в почечной ткани. Рядом авторов [5, 6], в том числе и нами, было показано, что введение экспериментальным животным некоторых L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, орнитин и др.) или не приводит к усилению выделения аммиака с мочой, или же в незначительной мере увеличивает его количество. Наши дальнейшие исследования показали, что *in vivo* из таких широко распространенных аминокислот, как глутаминовая и аспарагиновая, а также из орнитина образуется значительно меньше аммиака, чем *in vitro* в срезах коркового слоя почек. Кроме того, ферменты, осуществляющие деаминацию ряда L-аминокислот в корковом слое почек в условиях *in vivo*, находятся в значительной степени в ингибированном состоянии, что обусловлено наличием в сыворотке крови и почечной ткани определенного соединения белковой природы. Под действием сыворотки крови подавляется деаминация указанных аминокислот [3, 4].

В дальнейшем возникла необходимость выяснить природу ингибирующего действия сыворотки крови на активность аминокислотдеаминирующих ферментов в корковом слое почек.

*Материал и методика.* Срезы коркового слоя почек (по 100 мг) инкубировали в *Fr*еbs-Рингер—бикарбонатном буфере при  $t=37^{\circ}$ , в течение одного часа, после чего буферный раствор был заменен сывороткой крови (термообработанной, не содержащей основной массы белков) и инкубация была продолжена в течение еще одного часа. В других опытах в том же порядке срезы почек сначала инкубировали в сыворотке крови, а затем в буферном растворе. После инкубации путем центрифугирования сре-

зы отделяли от инкубационной жидкости и в последней определяли количество образовавшегося из добавленных аминокислот аммиака, а в срезах—содержание АТФ. На каждую пробу добавляли по 16 мкМ аминокислот. Аммиак определяли микродиффузионным методом по Конве, АТФ—по uv-тесту, используя соответствующий набор реактивов (Boehringer).

*Результаты и обсуждение.* Данные табл. 1 показывают, что в буферном растворе в течение двухчасовой инкубации срезы почек продуцируют из глутаминовой, аспарагиновой кислот и орнитина значительное количество аммиака (8,7, 11,5, 13,2 мкМ/г ткани соответственно), в то время как в среде сыворотки крови за этот же промежуток времени из этих же аминокислот—несравненно меньше (глутаминовая кисло-

Таблица 1

Обратимое ингибирование деаминарования L-аминокислот сывороткой крови в срезах коркового слоя почек белых крыс

Условия опыта	Глутамино- вая кислота	Аспарагино- вая кислота	Орнитин
Контрольный опыт — инкубация в среде буфера в течение 60 мин	6,2±0,5	9,8±0,9	11,7±1,3
Контрольный опыт — инкубация в среде буфера в течение 120 мин	8,7±0,9	11,5±1,2	13,2±1,2
Инкубация в среде сыворотки в течение 120 мин	0,7±0,1	2,5±0,4	4,5±0,9
Инкубация в среде сыворотки, на 60-й минуте она была заменена буфером и инкубация продолжалась еще 60 мин	4,6±0,7	7,3±0,7	9,0±1,0
Инкубация в среде буфера, на 60-й минуте он был заменен сывороткой и инкубация продолжалась еще 60 мин (данные за второй час)	0,5±0,05	2,0±0,3	3,8±0,4

Примечание: все опыты были проведены в атмосфере O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>.

та—0,7; аспарагиновая—2,5; орнитин—4,5 мкМ/г ткани). Интересно отметить, что замена сыворотки буферным раствором на 60-й минуте инкубирования приводит к восстановлению активности ферментов, осуществляющих деаминарование указанных аминокислот, при этом продукция аммиака за второй час инкубации составляет из глутаминовой кислоты—4,6, из аспарагиновой—7,3, из орнитина—9,0 мкМ/г ткани. Если же на 60-й минуте буферный раствор заменяется сывороткой крови, то наблюдается обратное явление, т. е. имеет место значительное снижение интенсивности образования аммиака из добавленных аминокислот, что особенно выражено в отношении глутаминовой кислоты.

Ранее нами было показано, что аммиакообразование из упомянутых аминокислот тесно связано с энергетическим состоянием почечной ткани [3]. Было интересно выявить сдвиги в энергетическом состоянии почечной ткани в зависимости от условий инкубации и интенсивности образования аммиака из аминокислот. В связи с этим мы определяли содержание АТФ в срезах почек при инкубации их в различных условиях.

Результаты исследований показали (табл. 2), что содержание АТФ в срезах почек, в зависимости от условий инкубации, претерпевает такие же изменения, что и аммиакообразование, т. е. при инкубации срезов почек в среде буфера даже несколько повышается содержание этого макроэргического соединения, в то время как в сыворотке крови оно снижается.

Таблица 2

Изменения содержания АТФ в срезах почек при инкубации их в различных условиях

Условия опыта	Содержание АТФ, мкМ/г ткани
Контроль (эндогенное количество)	0,35
Инкубация срезов почек в среде буфера 120 мин	0,54
Инкубация срезов почек в среде сыворотки крови	0,15
Инкубация срезов почек в среде буфера, на 60-й минуте буфер был заменен сывороткой крови	0,15
Инкубация срезов почек в среде сыворотки крови, на 60-й минуте сыворотка была заменена буфером	0,35

Примечание: все опыты были проведены в атмосфере высокого парциального давления кислорода.

Таким образом, наблюдается параллелизм между энергетическим состоянием почечной ткани и активностью ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот.

Результаты опытов показывают, что сыворотка крови обладает способностью обратимо ингибировать активность ферментов, осуществляющих деаминирование ряда аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой, орнитина) в корковом слое почек. Это явление имеет важное биологическое значение. Реакции деаминирования аминокислот в корковом слое почек вне организма, в буферном растворе, протекают с высокой скоростью, как это показали опыты со срезами почек. Если бы в живом организме эти процессы протекали с такой же интенсивностью, то за короткий промежуток времени запасы свободных аминокислот в тканях, в частности в почечной, истощились бы. Поэтому природа создала и другой механизм, регулирующий скорость течения этих процессов. Эта реакция в живом организме осуществляется на молекулярном уровне—на уровне ферментов, которые вне организма проявляют высокую каталитическую активность, между тем как в условиях *in vivo*, как это видно на примере инкубации срезов в среде сыворотки крови (а также под действием экстракта почек), их активность контролируется определенным соединением, ограничивающим пределы функциональной деятельности [4]. В результате в тканях обеспечивается определенный уровень фонда свободных аминокислот, необходимых для синтеза различных физиологически активных соединений (белков, пептидов, гормонов и др.).

По-видимому, *in vitro* в буферном растворе активность упомянутых ферментов в почечной ткани не подвергается тонкой регуляции, и они действуют преимущественно в одном направлении, т. е. деаминации. Регуляторный механизм деаминации аминокислот, как было нами показано ранее, обладает широкими возможностями. При определенных физиологических и патологических состояниях, когда возникает необходимость усиления образования аммиака (например, при ацидозе) для нейтрализации накопившихся в организме различных кислот, подавляются процессы синтеза циркулирующего в крови ингибитора, снижается его активность как в крови, так и в почечной ткани, что приводит к повышению активности соответствующих ферментов, осуществляющих деаминацию аминокислот, и усилению образования аммиака в почках [6].

Интересно отметить, что регуляция процессов деаминации аминокислот в почечной ткани этим ингибитором осуществляется путем изменения в ней содержания АТФ. Фосфорилирование ферментов осуществляется за счет АТФ, изменение содержания которого соответствующим образом отражается на этом процессе. Наши исследования показали, что условия, способствующие повышению содержания АТФ в срезах почек, как это наблюдается при их инкубации в буферном растворе в атмосфере высокого парциального давления кислорода, приводят к усилению фосфорилирования почечных белков, по-видимому, и ферментов, осуществляющих деаминацию указанных аминокислот, с последующим повышением их активности и ускорением процессов их деаминации. Наоборот, условия, способствующие снижению содержания АТФ, как это наблюдается при инкубировании срезов в среде сыворотки крови (а также в условиях низкого парциального давления кислорода), вызывают усиление дефосфорилирования почечных белков, очевидно и ферментов, вовлекающихся в процессы деаминации упомянутых аминокислот, что приводит к снижению их активности, следовательно, и к торможению процессов деаминации аминокислот.

Установлено, что при инкубировании срезов почек в атмосфере высокого парциального давления кислорода, когда повышается содержание АТФ, наблюдается также возрастание активности протеникиназы и усиление связывания меченого фосфора АТФ с белками почек, между тем как инкубация в среде сыворотки крови (а также в атмосфере низкого парциального давления кислорода), когда снижается содержание АТФ, приводит к подавлению этого процесса.

Опыты с кристаллической глутаматдегидрогеназой, проведенные нами, показали, что этот фермент является фосфопротеном и в присутствии фосфопротенинфосфатазы наблюдается отщепление неорганического фосфата и снижение его ферментативной активности. Эти исследования показали, что активность глутаматдегидрогеназы регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием, причем фосфорилирование приводит к повышению ее активности, а дефосфорилирование, на-

оборот, к снижению. Для выяснения вопросов регуляции активности ферментов, осуществляющих деаминирование L-аспарагиновой кислоты и L-орнитина, в связи с отсутствием чистых ферментных препаратов, необходимы дальнейшие исследования. Однако мы не сомневаемся, что их активность также регулируется путем фосфорилирования и дефосфорилирования, так как результаты исследований, проведенных со срезами почек, дают полное основание предполагать существование подобного механизма.

Таким образом, сыворотка крови обладает способностью обратимо ингибировать активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и L-орнитина и тем самым регулировать образование аммиака из этих аминокислот в почечной ткани. Не исключено, что сывороточный ингибитор, который, помимо почечной, содержится также и в других тканях (мозговой, мышечной, печеночной), путем изменения в них содержания АТФ, в зависимости от физиологического состояния организма, оказывает соответствующее (регулирующее) влияние на метаболические процессы, через изменение активности различных ферментов, путем усиления их фосфорилирования или дефосфорилирования.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 13.X 1980 г.

ԵՐԻԿԱՄԱՆՆԵՐԻ ԿԵՂԵՎԱՅԻՆ ՇԵՐՏՈՒՄ L-ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ԴԵԱՄԻՆԱՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԻ ՎՐԱ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ԱՐԳԵԼԱԿՈՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԲՆՈՒՅԹԻ ՇՈՒՐՋԸ

ժ. Ս. ԴԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Փորձերը ցույց են տվել, որ արյան շիճուկի ազդեցությունը տակ սպիտակ առնետների երկկամների կեղևային շերտի կտրվածքներում զգալիորեն ճնշվում է գլյուտամինաթթվի, ասպարագինաթթվի և օրնիտինի դեամինացման պրոցեսները և միաժամանակ նկատվում է աղենոզիտրիֆոսֆատի քանակության նվազում: Այդ արգելակումը վերանում է, երբ արյան շիճուկը փոխարինվում է բուֆերային լուծույթով: Ստացված տվյալները վկայում են, որ արյան շիճուկը վերոհիշյալ ամինաթթուների դեամինացման պրոցեսների վրա թողնում է դարձելի արգելակող ազդեցություն:

ON THE NATURE OF INHIBITORY ACTION OF BLOOD SERUM ON THE PROCESSES OF DEAMINATION OF L-AMINOACIDS IN THE RENAL CORTEX OF RATS

J. S. GEVORKIAN, A. S. OGANESSIAN

Received data show, that blood serum reversibly inhibites the deamination of some l-aminoacids (glutamate, aspartate and ornithine) in rat renal cortex slices. This phenomenon has an important biological significance for the regulation of above mentioned processes depending on physiological state of living organism.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятыан Г. Х., Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН СССР, 236, 6, 1493, 1977.
2. Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН АрмССР, 61, 2, 104, 1975.
3. Геворкян Ж. С. ДАН АрмССР, 69, 5, 272, 1979.
4. Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН АрмССР, 56, 2, 111, 1973.
5. *Canessa-Fisher M. A., Schalhouh R., Glabman S., De Haas J., Fitts R. F.* Am. J. Physiol., 204, 192, 1963.
6. *Churchill P. C., Malvin R. L.* Am. J. Physiol., 218, 241, 1970.