

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян

К вопросу деаминации орнитина в корковом слое почек белых крыс

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунтяном 21/XII 1973)

Исследования, проведенные нами за последние годы, показали, что в интактных клетках коркового слоя почек белых крыс ряд аминокислот подвергается интенсивному деаминации. Среди всех аминокислот наибольшая продукция аммиака наблюдается из глутаминовой, аспарагиновой кислот и, особенно, из орнитина (¹).

В других тканях, в отличие от почек, деаминация аминокислот или отсутствует, или же протекает в незначительной степени. Результаты предварительных исследований позволили заключить, что в коре почек деаминация отдельных аминокислот, в частности, глутаминовой, аспарагиновой кислот и орнитина осуществляется различными ферментными системами.

Для выяснения некоторых сторон этого вопроса, нами был проведен ряд исследований в различных условиях и в присутствии некоторых ингибиторов.

Опыты проводились со срезами коркового слоя почек (по 200 мг). Инкубацию проводили в Krebs-Рингер-бикарбонатном буфере, в аэробных условиях (O_2 —95%, CO_2 —5%), в течение одного часа, при $t = -37^\circ C$. Аминокислоты добавляли по 16 мкмоль на каждую пробу. Количества остальных добавленных веществ указаны в таблицах.

Как показывают результаты исследований (табл. 1), глутаминовая и аспарагиновая кислоты, а также орнитин в срезах коркового слоя почек продуцируют большое количество свободного аммиака, причем из аспарагиновой кислоты и орнитина образуется почти два раза больше аммиака чем из глутаминовой кислоты. При комбинации орнитина с глутаминовой или аспарагиновой кислотами уровень продуцированного аммиака составляет почти сумму содержания образовавшегося аммиака, которое наблюдалось при добавлении аминокислот в отдельности. Это показывает, что орнитин деаминируется отдельным ферментом, независимо от процессов деаминации глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Образование аммиака из L-аминокислот срезами почек
Средние данные из 8 опытов

Условия опыта	Прирост аммиака (мкмоль/г ткани/час)
Глютаминовая кислота	6.2 ± 0.7
Аспарагиновая кислота	10.9 ± 1.2
Орнитин	12.4 ± 1.0
Орнитин+глютаминовая кислота	18.1 ± 1.8
Орнитин+аспарагиновая кислота	21.8 ± 2.1

Влияние α-КГЛ и ЩУК на образование аммиака из L-аминокислот

Аминокислоты	Количество образующегося аммиака (мкмоль/г ткани/час)		
	контроль	при добавлении	
		α-КГЛ	ЩУК
Глютаминовая кислота	6.1 ± 0.8	2.4 ± 0.2	4.8 ± 0.7
Аспарагиновая кислота	10.6 ± 1.1	3.3 ± 0.5	5.7 ± 0.8
Орнитин	11.5 ± 1.6	10.9 ± 1.4	10.8 ± 1.5

Примечание: на каждую пробу добавляли α-КГЛ—10 мкмоль, ЩУК—10 мкмоль.

Влияние малоната (10 мМ) на образование аммиака (мкмоль/г ткани/час)
из L-аминокислот

Аминокислоты	Контроль	Малонат
Глютаминовая кислота	6.6 ± 0.8	4.2 ± 0.6
Аспарагиновая кислота	10.2 ± 1.0	4.7 ± 0.7
Орнитин	12.8 ± 0.65	11.7 ± 0.7

Наши исследования (табл. 2) показали, что α-КГЛ и ЩУК, как продукты деаминации L-глютаминовой и L-аспарагиновой кислот в незначительных концентрациях подавляют образование аммиака из этих аминокислот, однако этого эффекта не наблюдается в отношении орнитина.

Как видно из табл. 3, малонат в значительной мере подавляет образование аммиака из глютаминовой и аспарагиновой кислот, не оказывая заметного действия на деаминацию орнитина. По-видимому, малонат путем подавления активности сукциндегидрогеназы блокирует некоторые звенья процессов лимоннокислого цикла, в результате чего наблюдается накопление α-КГЛ в клетках, который, как уже было указано выше, подавляет в значительной степени деаминацию глютаминовой и аспарагиновой кислот, не оказывая особого влияния

Таблица 7

Влияние разбавления сыворотки крови на образование аммиака
из L-аминокислот (мкмоль/г ткани/час)
Средние данные из шести опытов

Название аминокислот	Контроль	Степень разбавления сыворотки крови							Неразбав- ленная сыворотка
		40 раз	20 раз	10 раз	6.6 раза	5 раз	4 раза	2 раза	
Глютаминовая кислота	6.0±0.5	4.5 ±0.5	3.2±0.5	2.5±0.5	2.0±0.3	1.0±0.3	0.75±0.1	0.65±0.1	0.65±0.1
Аспарагиновая кислота	10.5±0.5	9.5 ±0.8	8.0±1.0	6.5±1.2	5.8±0.5	4.5±0.5	3.8 ±0.5	4.0 ±0.1	1.5 ±0.15
Орнитин	11.0±1.0	10.75±1.0	11.0±1.2	10.0±0.7	8.0±1.2	7.5±1.5	7.2 ±1.0	6.0 ±1.0	5.5 ±0.7

Образование аммиака из L-аминокислот в присутствии гуанозинтрифосфата

Условия опыта	Количество образовавшегося аммиака
Глютаминовая кислота	6.3 ± 0.8
Аспарагиновая кислота	10.9 ± 1.2
Орнитин	13.6 ± 1.5
Глютаминовая кислота + ГТФ	3.3 ± 0.95
Аспарагиновая кислота + ГТФ	10.0 ± 0.9
Орнитин + ГТФ	12.6 ± 1.3

Образование аммиака из L-аминокислот в срезах коркового слоя почек белых крыс в различные периоды пре- и постнатальной жизни

Возраст подопытных животных	Глютаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин
Эмбрионы (последние дни беременности)	0	1.7 ± 0.2	0
Новорожденные	0	4.74 ± 0.65	0
12-дневные	0	8.0 ± 1.28	3.1 ± 0.5
16-дневные	1.5 ± 0.21	8.6 ± 0.97	4.2 ± 0.83

на продукцию аммиака из орнитина. После деаминирования аспарагиновой кислоты, образовавшаяся ЩУК, а также образовавшаяся из нее α -КГЛ могут быть причиной подавления аммиакообразования из аспарагиновой кислоты в присутствии малоната.

За последние годы в нашей лаборатории было показано наличие в сыворотке крови, а также в печеночной и почечной тканях, определенного вещества, оказывающего регулирующее действие на процессы деаминирования аминокислот в почках (возможно и в других органах). Результаты исследований показали, что по сравнению с орнитинем, процессы деаминирования глютаминовой и аспарагиновой кислот намного чувствительны к этому фактору. Как видно из табл. 4, даже при разбавлении сыворотки крови в 40 раз, отмечается определенное подавление продукции аммиака из глютаминовой и аспарагиновой кислот, в то время, как ингибирующее действие в отношении деаминирования орнитина проявляется, начиная с разбавления сыворотки в 6,6 раза.

Одним из известных ингибиторов глютаматдегидрогеназы является гуанозинтрифосфат (ГТФ). Результаты исследований (табл. 5) показывают, что ГТФ в значительной степени подавляет деаминирование глютаминовой кислоты, не оказывает особого влияния на продукцию аммиака из L-аспарагиновой кислоты и L-орнитина.

В другой серии опытов было показано, что процессы деаминирования отдельных аминокислот неодинаково чувствительны к изменению температуры инкубируемой среды. При повышении температуры до

15°C значительно возрастает продукция аммиака из орнитина и глутаминовой кислоты, при этом деаминарование аспарагиновой кислоты резко подавляется. Опыты по кинетике процессов деаминарования аминокислот, показали, что при инкубации срезов почек с аминокислотами раньше всего аммиак образуется из аспарагиновой кислоты и орнитина (на 3-ей минуте), между тем, как продукция аммиака из глутаминовой кислоты проявляется сравнительно позже (на 10-ой минуте). Было установлено также, что при диализе срезов почек (10 часов) резко страдает процесс деаминарования аспарагиновой кислоты (на 92%), в то время, как процессы деаминарования глутаминовой кислоты и орнитина подавляются в меньшей степени (59 и 40% соответственно).

Результаты проведенных нами исследований дают основание заключить, что эти три аминокислоты в корковом слое почек подвергаются деаминарованию не единой системой, а отдельными ферментными системами. Приведенные выше данные показывают, что процесс деаминарования орнитина во многом отличается от такового глутаминовой и аспарагиновой кислот. Одно то обстоятельство, что из орнитина получается значительно больше аммиака, чем из глутаминовой кислоты, говорит в пользу существования отдельной ферментной системы, осуществляющей деаминарование этой аминокислоты (орнитина). При добавлении к срезам почек глутаминовой кислоты в двухкратном размере по сравнению с орнитинном (в молярном отношении) выход аммиака значительно меньше, чем из орнитина. С другой стороны α -КГЛ в незначительной концентрации подавляет деаминарование глутаминовой и аспарагиновой кислот и не оказывает влияния на продукцию аммиака из орнитина. Если деаминарование орнитина протекало путем его предварительного превращения в глутаминовую кислоту, то в присутствии добавленного КГЛ должно было иметь место ускорение продукции аммиака из орнитина, чего не наблюдалось в наших опытах. При совместном добавлении к срезам почек орнитина с глутаминовой или аспарагиновой кислотами наблюдается суммирование эффектов деаминарования. Это показывает, что деаминарование добавленных аминокислот осуществляется отдельными ферментами. Об этом свидетельствуют также результаты опытов, проведенных в возрастном аспекте (табл. 6). Деаминарование орнитина в почечной ткани проявляется раньше (12-ый день постнатальной жизни), чем дегидрогеназа глутаминовой кислоты (16-ый день). Было также установлено, что аспарагиновая кислота подвергается деаминарованию как почками плода, так и новорожденных крыс, а орнитин и глутаминовая кислота у этих не служат источником аммиака (2).

Исследования проведенные в нашей лаборатории Л. А. Арутюнян показали, что в почках 6—7 дневных цыплят деаминарование упомянутых аминокислот протекает весьма интенсивно, у взрослых кур деаминарование глутаминовой и аспарагиновой кислот значительно понижается, между тем, как деаминарование орнитина почти не изменяется.

С другой стороны, при инкубации аммиак из орнитина образуется раньше, чем из глютаминовой кислоты. Следует отметить также, что в опытах с орнитином нам не удалось выявить наличие семиальдегид глютаминовой кислоты, что является промежуточным продуктом превращения орнитина в глютаминовую кислоту.

Результаты опытов, с применением сыворотки крови, также свидетельствуют об отличии процессов деаминирования орнитина от глютаминовой и аспарагиновой кислот. В присутствии сыворотки крови деаминирование глютаминовой и аспарагиновой кислот подавляется в большей степени, чем деаминирование орнитина.

Следует также отметить, что ГТФ не оказывает особого влияния на продукцию аммиака из орнитина.

И так, наши исследования показывают, что в почечной ткани L-орнитин подвергается интенсивному деаминированию отдельным ферментом (или системой ферментов), независимо от глютаматдегидрогеназы, при этом из одной молекулы орнитина образуется больше одной молекулы аммиака. Это показывает, что обе аминокислоты этой аминокислоты вовлекаются в процесс деаминирования. Отсюда возникает вопрос последовательности вовлечения этих аминокислот в процессе деаминирования. Не исключена возможность образования из орнитина промежуточного продукта α -кето- ω -аминовалериановой кислоты, деаминирование которого может протекать отдельным ферментом. У микроорганизмов орнитин подвергается деаминированию особым ферментом—орнитин-циклазой, под действием которой ω -аминогруппа орнитина подвергается деаминированию, с образованием аммиака и путем циклизации формируется пролин (³). Однако, как показали наши исследования, в почечной ткани выход аммиака из пролина небольшой.

Для выяснения механизма деаминирования орнитина необходимы дальнейшие исследования. Орнитин в значительной степени стимулирует дыхание почечной ткани, поэтому надо полагать, что углеродный остов этой аминокислоты подвергается окислению. Исследования по изолированию активного ферментного препарата, оказывающего действия на орнитин, пока не увенчались успехом. Следует отметить, что при нарушении целостности почечной клетки процессы деаминирования орнитина (а также глютаминовой и аспарагиновой кислот) резко угнетаются. По-видимому, процессы деаминирования аминокислот связаны с активным мембранным транспортом, который в настоящее время изучается нами.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային շերտում օրնիտինի դեամինացման հարցի շուրջը

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային շերտի կտրվածքների վրա: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ այդ հյուսվածքներում օրնիտինը բավական բարձր ինտենսիվությամբ ենթարկվում է դեամինացման: Ամինաթթուների մեջ ամենից շատ ամիակ ստացվում է օրնիտինից:

Որոշ հեղինակներ ենթադրում էին, որ օրնիտինը 2-կետոգլյուտարաթթվի հետ տրանսամինացման ճանապարհով նախօրոք վեր է ածվում գլյուտամինաթթվի, որն իր հերթին դեամինացման է ենթարկվում գլյուտամինաթթվի դեհիդրոգենազայի օգնությամբ: Բայց մեր կողմից տարբեր պայմաններում և մի շարք ինհիբիտորների ներկայությամբ դրված փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ օրնիտինը դեամինացվում է առանձին ֆերմենտով, անկախ գլյուտամինաթթուի և ասպարագինաթթուի դեամինացնող սիստեմներից: Հնարավոր է, որ այդ ամինաթթվի դեամինացման պրոցեսներին մասնակցում են ոչ թե մեկ, այլ մի քանի ֆերմենտներ:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Г. Х. Бунятян, А. С. Оганесян и Ж. С. Геворкян, ДАН СССР, 177, 951 (1967).
² Г. Х. Бунятян, А. С. Оганесян, Ж. С. Геворкян и К. А. Чобинян, ДАН Арм. ССР, Т. 47, №1, 31 (1968).
³ R. N. Costilow, L. Luvcock, J. Biol. chem. 246, 6655 (1971)