

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян

Роль сульфгидрильных групп в механизме действия
сывороточного ингибитора на процессы аммиакообразования
из L-аминокислот в почечной ткани

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 27/V 1975)

Наши прежние исследования показали (^{1,2}), что сыворотка крови белых крыс (а также человека и кроликов) содержит определенные вещества, которые регулируют процессы деаминирования аминокислот в почечной ткани. Было установлено, что среди них имеются как активаторы, так и ингибиторы этих процессов. Нам удалось выделить и в определенной степени очистить вещество, оказывающее тормозящее действие на деаминирование аминокислот. Оно термостабильное, не подвергается диализу и имеет белковую природу (возможно полипептид, связанный с белковым носителем).

В дальнейшем мы задались целью выяснить участие сульфгидрильных групп в механизме действия этого вещества (тормозящего). С этой целью мы изучали влияние специфического тиолового реагента—5,5-дитиобис (2-нитробензойная кислота—ДТНБ) и цистеина на активность тормозящего фактора сыворотки крови в отношении образования аммиака из различных аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая и орнитин) в корковом слое почек. Опыты проводились со срезами коркового слоя почек белых крыс, по методике, описанной нами раньше (²). К инкубационной среде аминокислоты добавляли по 16 мкМ на пробу, концентрация тиолового реагента—ДТНБ в инкубационной среде составляла 10^{-3} М, а цистеина— 10^{-3} и $2 \cdot 10^{-3}$ М. Сыворотку крови белых крыс денатурировали в кипящей водной бане в течение 15 минут, затем путем центрифугирования отделяли супернатант, в котором оказалось активное вещество, обладающее тормозящим эффектом в отношении деаминирования аминокислот. Эта жидкость нами была использована в качестве инкубационной среды. В результате этой процедуры белки сыворотки крови почти полностью осаждались и только их незначительное количество обнаруживалось в надосадочной жидкости.

Результаты исследований (табл. 1) показали, что при добавлении к срезам почек ДТНБ образование аммиака из аминокислот значительно подавляется. При инкубации срезов почек в сыворотке крови наблюдается более выраженное торможение аммиакообразования. Интересно отметить, что при предварительном блокировании SH-групп ферментов, осуществляющих деаминирование упомянутых аминокислот,

Таблица 1
Влияние сыворотки крови и ДТНБ на образование аммиака (мкМ/г ткани/час) из L-аминокислот в срезах почек.
Средние данные из шести опытов

Условия опыта	Глютаминная кислота		Аспарагиновая кислота		Орнитин	
	количество аммиака	процент ингибирования	количество аммиака	процент ингибирования	количество аммиака	процент ингибирования
Контроль (в среде буфера)	6.1±0.2		12.7±0.6		13.4±0.5	
ДТНБ (10 ⁻³ М) в среде буфера	4.3±0.3	29.5	7.9±0.25	37.8	8.7±0.3	35.1
Сыворотка	0.25±0.02	95.5	2.9±0.1	77.2	5.0±0.2	62.7
ДТНБ (10 ⁻³ М) + сыворотка	0	100	2.0±0.1	84.3	4.4±0.2	67.2
Сыворотка + ДТНБ (10 ⁻³ М)	0	100	2.7±0.1	78.8	4.8±0.1	64.2

Таблица 2
Влияние преникубации срезов почек и сыворотки крови с цистеином на образование аммиака (мкМ/г ткани/час) из L-аминокислот
Средние данные из шести опытов

Условия опыта	Глютаминная кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин
Контроль (буфер)	5.7±0.1	11.2±0.2	13.5±0.2
Цистеин (10 ⁻³ М, буфер)	5.9±0.2	11.5±0.2	13.2±0.6
Цистеин (2.10 ⁻³ М, буфер)	5.8±0.1	11.7±0.5	13.3±0.8
Сыворотка	0.2±0.02	2.9±0.08	5.0±0.05
Сыворотка преникубирована с цистеином 10 ⁻³ М, 20 мин. и добавлена к срезам	0.55±0.07	2.8±0.1	5.1±0.2
Сыворотка преникубирована с цистеином 2.10 ⁻³ М 20 мин. и добавлена к срезам	1.3±0.09	5.4±0.3	7.5±0.3
Срезы преникубированы в среде буфера с цистеином 10 ⁻³ М 20 мин. затем добавлена сыворотка	0.5±0.07	2.6±0.3	4.8±0.5
Срезы преникубированы в среде буфера с цистеином 2.10 ⁻³ М 20 мин. затем добавлена сыворотка	1.2±0.09	5.1±0.2	7.3±0.4
Сыворотка преникубирована с ДТНБ 10 ⁻³ М 20 мин. затем добавлена к срезам	0.3±0.02	2.9±0.04	4.7±0.2

при помощи ДТНБ, с последующим добавлением сыворотки крови, отмечается дальнейшее усиление подавления процессов деаминирования аминокислот, причем в этих условиях деаминирование глютаминовой кислоты полностью прекращается, а деаминирование аспарагиновой кислоты и орнитина подавляются на 84,2 и 67,2% соответственно. Между тем, как при предварительной инкубации срезов в среде сыворотки крови с последующим добавлением тиолового реагента, наблюдается эффект сыворотки.

Эти данные показывают, что SH-группы ферментов осуществляющих деаминирование как глютаминовой, так и аспарагиновой кислот и орнитина, играют важную роль в процессах образования аммиака из них. С другой стороны, дальнейшее усиление торможения аммиакообразования из аминокислот под действием сыворотки крови, при предварительном блокировании SH-групп ферментов, свидетельствует о том, что кроме сульфгидрильных, в составе этих ферментов имеются и другие функционально-активные группы, которые принимают участие в механизме действия ингибирующего фактора сыворотки крови.

В следующей серии опытов изучалось влияние цистеина на ингибирующий эффект сыворотки крови. С этой целью срезы почек преникубировали с цистеином в течение 20 минут, а затем добавляли сыворотку крови и продолжали инкубацию в течение 60 минут. Как видно из табл. 2, цистеин в концентрации 10^{-3} М сам по себе не оказывает особого влияния на образование аммиака из аминокислот при инкубировании почечных срезов в буфере и не устраняет ингибирующий эффект сыворотки крови, между тем как при повышении его концентрации до $2 \cdot 10^{-3}$ М наблюдается частичное устранение подавляющего эффекта сыворотки.

Для выяснения наличия SH или S—S групп в составе ингибирующего фактора и их возможной роли в механизме его действия, сыворотку крови подвергали предварительной инкубации с цистеином или реактивом ДТНБ и затем добавляли к срезам почек. Полученные результаты (табл. 2) показали, что при добавлении к срезам преникубированной с цистеином сыворотки, отмечается некоторое ослабление ее тормозящего эффекта. Между тем как преникубирование сыворотки крови с тиоловым реагентом, с последующим добавлением ее к срезам почек, не оказывает особого влияния на процессы образования аммиака из аминокислот, по сравнению с действием одной сыворотки крови.

В следующей серии опытов мы изучали влияние сыворотки крови на образование аммиака из аминокислот после предварительной инкубации срезов почек с соответствующими субстратами (аминокислотами) в среде буфера. Опыты показали (табл. 3), что и в этих условиях тормозящий эффект сыворотки частично устраняется, что более выражено в отношении образования аммиака из глютаминовой кислоты.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в сыворотке крови содержится вещество, которое в значительной степени ингибирует образование аммиака из аминокислот и этим путем регулирует процессы их деаминирования. Каков механизм его действия?

Многочисленными исследованиями установлено, что сульфгидрильные группы играют важную роль в механизме действия глутаматдегидрогеназы, глутаминазы и других ферментов, принимающих участие в процессах образования аммиака. Наши исследования также показывают, что в присутствии такого специфического реагента тиоловых групп, как ДТНБ, подавляются процессы деаминирования аминокислот в срезах коркового слоя почек. Надо полагать, что в этих условиях блокируются сульфгидрильные группы глутаматдегидрогеназы и ферментов, осуществляющих деаминирование аспарагиновой кислоты и орнитина. В присутствии сыворотки крови наблюдается более выраженное подавление аммиакообразования, чем под действием ДТНБ в концентрации 10^{-3} М. Предварительная инкубация сыворотки с цистеином частично устраняет её тормозящий эффект, между тем как преинкубация

Таблица 3

Влияние преинкубации срезов почек с аминокислотами на образование аммиака (мкМ/г ткани/час) из них в присутствии сыворотки крови
Средние данные из пяти опытов

Условия опыта	Глутамино- вая кислота	Аспарагино- вая кислота	Орнитин
Контрольный опыт, преинкубация срезов (20 мин.) с аминокислотами в среде буфера	$5,9 \pm 0,03$	$10,4 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,2$
Сыворотка	$0,2 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,13$
Преинкубация срезов (20 мин.) с аминокислотами в среде сыворотки	$0,5 \pm 0,04$	$2,9 \pm 0,13$	$4,4 \pm 0,2$
Преинкубация срезов (20 мин.) с аминокислотами в среде буфера + сыворотка	$3,2 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,13$

сыворотки с ДТНБ почти не оказывает влияния на ингибирующий эффект сывороточного фактора. С другой стороны при предварительном блокировании SH групп ферментов тиоловым реагентом, тормозящий эффект сыворотки крови проявляется в неполной мере. Это показывает, что тиоловые группы ферментов, принимающих участие в процессах деаминирования вышеупомянутых аминокислот, играют определенную роль в механизме действия сывороточного ингибитора. Добавление сыворотки крови после тиолового реагента вызывает дальнейшее усиление подавления аммиакообразования, однако их ингибирующий эффект не суммируется. Результаты этих исследований дают основание полагать, что в механизме действия сывороточного фактора на процессы деаминирования аминокислот, наряду с сульфгидрильными, определенную роль играет и другая функциональная группа (или группы) ферментов. Не исключена возможность, что в составе сывороточного ингибитора содержатся дисульфидные группы, играющие важную роль в механизме его действия, так как цистеин в значительной мере устраняет его ингибирующий эффект.

При предварительном инкубировании срезов с аминокислотами отмечается некоторое ослабление эффекта ингибирующего фактора, что указывает на наличие конкурентного взаимоотношения между ними.

Как отмечалось выше, сыворотки крови содержат как ингибиторы, так и активаторы процессов деаминирования аминокислот. Опыты показали, что активность ингибитора значительно превышает активность активатора. Биологическое значение этого явления, по видимому, состоит в сбережении физиологически активных соединений (аминокислоты) для использования их в процессах, имеющих более важное значение для организма (синтез белков и др.).

Нужно полагать, что *in vivo* эти вещества, действуя совместно, регулируют процессы деаминирования аминокислот в почках в соответствии с физиологическим состоянием организма (кислотно-щелочное равновесие, режим питания и др.).

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Գ. Ս. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ա. Ս. ՕԳԵՆԵՅԱՆ

Սույֆհիդրիլ խմբերի դերը Երիկամային նյութափոխանման ամինաթթուներից ամինակի առաջացման վրա շինուկի արգելակող ֆակտորի ազդեցության մեխանիզմում

Փորձերը ցույց են տվել, որ արյան շինուկը պարունակում է սպիտակուցային բնույթի որոշակի նյութ, որն արգելակում է որոշ ամինաթթուների (գլյուտամինաթթու, ասպարադինաթթու, օրնիտին) դեամինացումն երիկամների կեղևային կտրվածքներում: Ցույց է տրվել, որ SH—խմբերի հետ միասին, իշյալ ամինաթթուները դեամինացնող ֆերմենտների կազմում գոյություն ունեն ֆունկցիոնալ տեսակետից ակտիվ այլ խմբեր (կամ խումբ), որոնք մասնակցում են արյան շինուկի արգելակող ֆակտորի ազդեցության մեխանիզմում:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ Ж. С. Геворкян, А. С. Огнесьян, ДАН АрмССР, т. 59, № 2 (1974); А. С. Огнесьян, Ж. С. Геворкян, ДАН АрмССР, т. 56, № 2 (1973).

