

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян

К механизму регуляции образования аммиака из глутамина
 и глутаминовой кислоты в почках

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 23/VI 1975)

Процессы образования аммиака в почках и его выделение с мочой в зависимости от физиологического состояния живого организма, привлекает внимание многих исследователей. Установлено, что при ацидотических состояниях организма стимулируется продукция аммиака из глутамина в почках и усиливается выделение его с мочой (1-3). За последние годы интенсивно изучаются механизмы регуляции этих процессов.

Ряд авторов установил, что при ацидозе содержание глутаминовой кислоты в почечной ткани снижается, а активность глутаминазы I, наоборот—повышается (4,5). Предполагается, что при ацидозе в результате ускорения утилизации образовавшейся из глутамина глутаминовой кислоты (через глутамат-дегидрогеназный путь или через переаминирование), снижается ее содержание в почечной ткани, что приводит к деингибированию глутаминазы I и усилению деамидирования глутамина (4-8).

По данным ряда авторов (6-9, 10), глутаминовая кислота является мощным ингибитором глутаминазы I, активность которой *in vivo* в значительной степени ингибирована этой аминокислотой.

В наших прежних исследованиях (11) было установлено, что сыворотка крови содержит вещество, которое в значительной мере подавляет процессы деаминирования глутаминовой кислоты в почечной ткани и этим путем оказывает регулирующее действие на его обмен. В связи с этим, представляло большой интерес изучить процессы образования аммиака из глутамина в почечной ткани в присутствии сыворотки крови, содержащей ингибитор процесса деаминирования глутаминовой кислоты. Интерес к этому вопросу обусловлен тем, что с одной стороны глутамин является основным источником аммиака мочи, а с другой—*in vivo* межклеточная жидкость, которая омывает почечные клетки по своему химическому составу сходна с сывороткой крови.

Опыты проводили со срезами коркового слоя почек, которые (10-200 мг) инкубировали в Krebs-Рингер—бикарбонатном буфере (2 мл) pH-8,4 при 1-37°C в течение одного часа. Изучали образование аммиака из глутамина срезами коркового слоя почек контрольных и ацидотических крыс в присутствии и отсутствии сыворотки крови. Параллельно

определяли содержание глютаминовой кислоты в почечной ткани. Ацидоз вызывали хлористым аммонием (крысы взамен питьевой воды получали однопроцентный раствор хлористого аммония в течение 7 дней). В инкубационную среду аминокислоты добавляли по 16 мкМ, а в отдельных случаях по 4 мкМ.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, при ацидозе усиливается выделение аммиака с мочой. У контрольных животных с мочой за 24 часа выделяется 156,8 мкМ аммиака, а у ацидотических — 239,7 мкМ. Срезы коркового слоя почек ацидотических крыс, по сравнению с контрольными, продуцируют из ряда аминокислот (глютаминовая, аспарагиновая, орнитин) и глютамина больше аммиака (табл. 2). В этом отношении особый интерес представляет глютамин, который по сравнению с другими аминокислотами более интенсивно поглощается почками (особенно при ацидозе) и подвергаясь деаминированию в почках служит основным источником аммиака мочи.

Таблица 1

Влияние ацидоза на выделение аммиака с мочой у белых крыс
Средние данные из 7 опытов

Условия опыта	Количество аммиака в мкмолях за 24 часа
Контрольные крысы	156,8 ± 8,1
Ацидотические крысы	239,7 ± 7,9

Таблица 2

Влияние ацидоза на образование аммиака из L-аминокислот (инкубационная среда — Кребс — Рингер — бикарбонатный буфер) в срезах почек (мкМ/г ткани/час)
Средние данные из 5 опытов

Нормальные крысы				Ацидотические крысы			
Глютаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин	Глютамин	Глютаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин	Глютамин
5,1 ± 0,22	9,3 ± 0,41	11,6 ± 0,58	27,7 ± 1,7	7,4 ± 0,44	12,2 ± 0,31	15,9 ± 0,5	34,2 ± 1,0

Таблица 3

Влияние сыворотки крови ацидотических крыс на образование аммиака из аминокислот (мк моль/г ткани/час)
Средние данные из 5 опытов

Сыворотка нормальных крыс				Сыворотка ацидотических крыс			
Глютаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин	Глютамин	Глютаминовая кислота	Аспарагиновая кислота	Орнитин	Глютамин
0	2,7 ± 0,28	4,9 ± 0,28	22,6 ± 0,5	2,5 ± 0,33	4,9 ± 0,36	6,1 ± 0,42	26,0 ± 0,68

Интересные результаты были получены при применении сыворотки крови ацидотических и контрольных крыс в качестве инкубационной среды. Как показывают данные, приведенные в табл. 3, сыворотка крови контрольных крыс в значительной степени подавляет образование аммиака из ряда аминокислот. В отношении глутамина (в этих опытах) торможение аммиакообразования проявляется в невыраженной форме.

Между тем, как при инкубации срезов почек контрольных крыс в среде сыворотки крови ацидотических животных, наблюдается значительное ослабление ингибирующего действия сыворотки этих животных на процессы аммиакообразования из упомянутых аминокислот.

Таблица 3

Изменения содержания глутаминовой кислоты в корковом слое почек при ацидозе
Средние данные из 5 опытов

Условия опыта	Количество глутаминовой кислоты в мкмолях/г ткани
Контрольные крысы	9,3±0,16
Ацидотические крысы	7,8±0,24

Опыты показали, что при ацидозе содержание глутаминовой кислоты в корковом слое почек снижается по сравнению с контрольными животными (табл. 4), что свидетельствует об усилении утилизации этой аминокислоты.

Имея в виду вышесказанное, а также известный факт о том, что глутаминовая кислота является ингибитором фосфатзависимой глутаминазы коры почек (6, 9, 10), мы предполагали, что *in vivo* вышеупомянутый сывороточный фактор, по-видимому, путем регуляции обмена глутаминовой кислоты, оказывает соответствующее влияние также на глутаминазную реакцию почек, следовательно, и на образо-

Таблица 4

Влияние глутаминовой кислоты на образование аммиака (мкМ/г ткани/час) из глутаминна
Средние данные из 7 опытов

Условия опыта	Количество образовавшегося аммиака	Количество аммиака глутаминна
Буфер		
Глутаминовая кислота	2,5±0,33	1,6±0,15
Глутамин	7,9±0,3	3,7±0,24
Глутамин+глутаминовая кислота	8,1±0,7	6,1±0,34
Сыворотка		
Глутаминовая кислота	0	1,4±0,16
Глутамин	1,7±0,2	3,1±0,1
Глутамин+глутаминовая кислота	3,6±0,2	6,9±0,16

вание аммиака из глутаминна, в зависимости от физиологического состояния живого организма.

Для выяснения этого вопроса в дальнейшем мы изучали влияние глутаминовой кислоты на образование аммиака из глутаминна в присутствии и отсутствии сыворотки крови. В этих опытах к срезам почек добавляли глутаминовую кислоту и глутамин в количестве 4 мкмоль на пробу (ближе к физиологическим содержаниям). Результаты исследований (табл. 5) показали, что при проведении опытов в среде Krebs-Рингер-бикарбонатного буфера, добавленная глутаминовая кислота в определенной мере подавляет образование аммиака из глутаминна. При этом в конце опыта в инкубированной пробе определяется больше глутаминна, чем в опытах с одним глутамином.

Как видно из этой же таблицы в среде сыворотки крови срезы почек не продуцируют аммиак из глутаминовой кислоты, а выход аммиака из глутаминна значительно уменьшается. При добавлении глутаминна совместно с глутаминовой кислотой отмечается четкое подавление образования аммиака из глутаминна, при этом содержание аммиачного азота в этой пробе выше, чем это отмечается в пробе, где добавлен только глутамин.

Таблица 6

Изменение содержания глутаминовой кислоты при инкубация срезов почек в присутствии и отсутствии сыворотки крови (мк Мг ткани—мл среды)
Средние данные из 6 опытов

Условия опыта	Буфер		Сыворотка	
	Среда	Ткань	Среда	Ткань
Контроль	0.93±0.09	3.9±0.16	2.7±0.2	6.4±0.23
Глутаминовая кислота	1.66±0.18	4.9±0.1	5.2±0.11	7.0±0.19
Глутамин	2.5±0.18	5.6±0.1	5.0±0.34	7.2±0.61
Глутаминовая кислота+глутамин	1.7±0.33	5.9±0.71	6.0±0.3	8.5±0.7

Параллельные исследования по определению содержания глутаминовой кислоты (табл. 6) показали, что при проведении опытов в среде сыворотки крови, в пробах с глутамином и глутаминовой кислотой определяется больше глутаминовой кислоты, чем в соответствующих пробах, инкубированных в среде Krebs-Рингер-бикарбонатного буфера.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что глутаминовая кислота ингибирует фосфатзависимую глутаминазу почечной ткани, как это наблюдалось и в опытах других исследователей (6,9,10). С другой стороны, в присутствии сыворотки крови деаминирование глутаминна и деаминирование глутаминовой кислоты значительно подавляются.

Наши исследования показали, что сыворотка крови содержит вещество, тормозящее процесс деаминирования глутаминовой кислоты (11). В результате ингибирования активности глутаматдегидрогеназы

веществом, содержащимся в сыворотке крови, образовавшаяся из глутамина глутаминовая кислота (через глутаминазную реакцию) накапливается в почечных клетках и путем обратной связи оказывает тормозящий эффект на активность глутаминазы I и, следовательно, на образование аммиака из глутамина. Добавление извне глутаминовой кислоты, приводит к более выраженному подавлению образования аммиака из глутамина.

Подобное объяснение подтверждается исследованиями по определению содержания глутаминовой кислоты в инкубированных пробах. В опытах, проведенных с сывороткой крови с добавлением глутамина и глутаминовой кислоты, содержание глутамата выше по сравнению с опытами, проведенными в среде буфера. Это свидетельствует о том, что в присутствии сыворотки крови деаминирование глутаминовой кислоты подавляется. В опытах, проведенных в среде буфера, подавление образования аммиака из глутамина в присутствии добавленной глутаминовой кислоты менее выражено, чем в среде сыворотки крови, что связано с деаминированием, как добавленной, так и образовавшейся из глутамина глутаминовой кислоты в среде буфера.

Результаты исследований, проведенных с ацидотическими животными, подтвердили высказанное нами мнение относительно регулирующей роли сывороточного фактора в обмене глутаминовой кислоты, и через нее глутаминазной реакции. При ацидозе наблюдается значительное понижение активности сывороточного регулятора деаминирования глутаминовой кислоты, в результате чего скорость деаминирования глутаминовой кислоты возрастает, а содержание ее в почечной ткани снижается, что приводит к деингибированию глутаминазы I и, следовательно, к усилению образования аммиака из глутамина. Из табл. 5 видно, что в среде сыворотки крови образование аммиака из глутамина подавляется в значительной степени, добавление глутаминовой кислоты в этих опытах приводит к небольшому усилению этого явления. Можно полагать, что помимо глутаминовой кислоты в сыворотке крови содержится другой фактор, регулирующий обмен глутамина. В ходе наших исследований было установлено, что при инкубации срезов почек с глутамином, особенно в среде сыворотки крови определенное количество глутамина исчезает. Возможно, что при этом глутамин вовлекается в другие биохимические процессы.

Из крови белых крыс, наряду с ингибитором, нам удалось выделить и вещество, оказывающее стимулирующее действие на процессы деаминирования глутаминовой кислоты. Не исключена возможность, что усиление образования аммиака из глутамина и глутаминовой кислоты при ацидозе, связано также с повышением активности этого вещества.

Ներկայումս գլյուտամինից և գլյուտամինաթթվից ամիակի առաջացման կարգավորման մասին

Ցույց է տրված, որ սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային շերտի կտրվածքները, Կրեթա-Ռինդեր-բիկարրոնատային բուֆերում ինկուբացիայի ենթարկելու դեպքում գլյուտամինից և մի շարք ամինաթթուներից (գլյուտամինաթթու, ասծարագինաթթու, օրնիտին) արտադրում են զգալի քանակությամբ սպաս ամիակ, մինչդեռ երբ ինկուբացիոն միջավայրի բուֆերը փոխարինվում է արյան շիճուկով, ամիակի առաջացումը հիշյալ ամինաթթուներից զգալիորեն ընկճվում է, որն առանձնապես արտահայտվում է գլյուտամինաթթվի նկատմամբ: Ցույց է տրված, որ արյան շիճուկը սպարուենակում է սպիտակուցային բնույթի մի նյութ, որն արգելակում է գլյուտամինաթթվի դեզամինացման սրոզեսները: Արյան շիճուկի ներկայությամբ երիկամների կրտրվածքներում գլյուտամինի քայքայումից առաջացած գլյուտամինաթթվի դեամինացման արգելակման հետևանքով վերջինս կուտակվում է և հետագործ ճանապարհով ճնշում է գլյուտամինազայի ակտիվությունը, հետևապես և որոշ շափով արգելակում (կարգավորում) ամիակի առաջացումը գլյուտամինից:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ E. E. Owen a. R. R. Robinson, J. clin. invest., 42 (2), 263 (1963). ² R. F. Pitts, Am. J. Physiol., 220, 862 (1971). ³ A. C. Ozanecян, Л. А. Арутюнян, Журн. экп. и клинич. мед., 13 (2), 14 (1973). ⁴ I. Goldstein, Am. J. Physiol., 210, 661 (1966). ⁵ H. G. Preuss, Nephron, 6, 235 (1969). ⁶ I. A. Goldstein, J. M. Schooler, Adv. enzyme regul., 5, 71 (1967). ⁷ A. D. Goodman, J. Lab. a. Clin. Med., 81, 905 (1973). ⁸ H. G. Preuss, Vivastil—Monas O. a. Vertino L. L., J. Clin. invest., 52, 755 (1973). ⁹ N. Katunuma, A. Huzino, a. Tomino J., Adv. Enzyme regul., 5, 55, 1967. ¹⁰ F. N. Saire, E. Roberts, a. J. Biol. Chem., 233, 1128, 1958. ¹¹ A. C. Ozanecян, Ж. С. Геворкян-ՄԱՆ Արս. ССР, т. 56, № 2, III (1973).