УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян

**Влияние различного парциального давления кислорода
на интенсивность деаминации некоторых L-аминокислот
в корковом слое почек**

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 21/X 1977)

Исследованиями Кребса, Браунштейна и др. авторов (1,2) было показано, что в корковом слое почек некоторые аминокислоты (глутаминовая, аспарагиновая, аланин) подвергаются интенсивному деаминации, с образованием значительного количества свободного аммиака. Нашими исследованиями (3) установлено, что в срезах коркового слоя почек помимо вышеупомянутых аминокислот, источником аммиака являются также и ряд других аминокислот, как аргинин, лизин, пролин и, особенно, орнитин, из которого образуется наибольшее количество аммиака. Эти процессы протекают в интактных клетках (срезы), требуют аэробные условия и присутствие ионов калия и, особенно, натрия (3).

В дальнейшем мы задались целью изучить интенсивность деаминации некоторых аминокислот при различных энергетических состояниях клеток коркового слоя почек. Различные энергетические уровни клетки создавали путем преинкубации срезов почек в атмосфере газового состава с неодинаковым парциальным давлением кислорода. Опыты проводили со срезами коркового слоя почек белых крыс, которые по 200 мг преинкубировали 60 мин. при $t +37^{\circ}\text{C}$ в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере, $\text{pH} = 7.4$ в атмосфере с высоким (кислород—95% и CO_2 —5%) и низким парциальными давлениями кислорода (воздух), после чего добавляли аминокислоты (по 16 мкМ) и продолжали инкубацию в атмосфере с высоким содержанием кислорода в течение 60 минут. В некоторых опытах, проведенных в атмосфере воздуха, перед преинкубацией добавляли АТФ и НАД (2 и 3 мг на пробу, соответственно). После инкубации определяли количество образовавшегося аммиака (путем микродиффузии по Конве) и содержание свободных аминокислот (методом электрофореза на бумаге) в инкубационной среде. В течение инкубации (после преинкубации) определяли также тканевое дыхание.

Результаты исследований (табл. 1) показали, что при часовой преинкубации срезов почек в условиях высокого парциального давления кислорода, по сравнению с контрольными опытами (инкубация в условиях высокого парциального давления кислорода, без преинкубации), отмечается значительное усиление процессов деаминации аминокислот. При этом прирост, образовавшегося из аминокислот, аммиака значительно превышает соответствующие контрольные величины: в отношении глутаминовой кислоты—36,0%, аспарагиновой кислоты 57,4% и орнитина—49%. Часовая преинкубация срезов в атмосфере воздуха (с последующей инкубацией в условиях высокого парциального давления кислорода) приводит к значительному снижению интенсивности процессов деаминации аминокислот по сравнению с контрольными опытами: в отношении глутаминовой кислоты на 75,8%, аспарагиновой кислоты—63,8% и орнитина—51,9%. При проведении преинкубации, а также инкубации, в условиях воздуха, наблюдается более выраженное подавление процессов деаминации аминокислот.

Параллельно проведенные опыты показали (табл. 2), что утилизация аминокислот срезами почек в условиях высокого парциального давления кислорода, по сравнению с низким, протекает более интенсивно, что гармонирует с результатами тканевого дыхания и продукции аммиака.

Нами предполагалось, что угнетение процессов деаминации аминокислот при преинкубации срезов почек в атмосфере воздуха связано с низким уровнем тканевого дыхания, в результате чего снижается энергетическое состояние почечных клеток. В связи с этим, в отдельной серии опытов мы изучали поглощение кислорода срезами почек в период инкубации (после проведения преинкубации), а также влияние добавленных АТФ и НАД на аммиакообразование из аминокислот в срезах почек, преинкубированных в условиях воздуха.

Результаты этих опытов (табл. 1) показали, что аминокислотдеаминирующая способность почечных срезов сохраняется на сравнительно высоком уровне если преинкубация в атмосфере воздуха проводится в присутствии АТФ и НАД. С другой стороны, установлено (табл. 3), что дыхательная способность срезов почек, преинкубированных в атмосфере высокого парциального давления кислорода значительно превышает контрольные величины, а преинкубированных в атмосфере воздуха, наоборот, намного ниже от контрольных данных.

Надо было полагать, что наблюдаемое усиление деаминации аминокислот при преинкубации почечных срезов в условиях высокого парциального давления кислорода обусловлено или повышением активности соответствующих ферментов, осуществляющих деаминацию аминокислот или же усилением их синтеза *de novo* в ходе преинкубации срезов. Для выяснения этого вопроса срезы почек предварительно инкубировали в аэробных условиях, в присутствии известных ингибиторов процессов синтеза белка—циклогексимида (50 мкг/мл) и актиномицина «Д» (5 мкг/мл). Результаты этих исследований (табл. 1) показали, что как циклогексимид, так и актиномицин «Д» предот-

вращают наблюдаемые в предыдущих опытах усиление деаминирования аминокислот срезами почек, преинкубированных в атмосфере высокого парциального давления кислорода.

Вышеприведенные данные показывают, что различие в парциальных давлениях кислорода в атмосфере, где инкубируются срезы почек оказывает существенное влияние на активность ферментов, осуществляющих деаминирование аминокислот. Не исключена возможность, что подобное явление имеет место также в отношении других ферментов.

Надо полагать, что *in vitro* при наличии высокого парциального давления кислорода, для обеспечения внутриклеточных метаболических процессов энергией в срезах почек, более интенсивно утилизируются как эндогенные, так и добавленные аминокислоты, что сопровождается значительным усилением тканевого дыхания, как это показали также и наши прежние исследования (3). Циклогексимид и актиномицин «Д» снимают эффекты усиления аминокислотобразования из аминокислот, что указывает на стимулирование процессов синтеза ферментов *de novo*, осуществляющих деаминирование аминокислот в ходе преинкубации почечных срезов в условиях высокого парциального давления кислорода. Можно полагать, что в этих условиях в срезах

Таблица 1

Влияние некоторых факторов на образование аммиака из аминокислот в срезах коркового слоя почек
Средние данные из 8 опытов

Условия опыта	Количество образовавшегося аммиака (в мкмольх/г ткани/час) при добавлении		
	глутаминовая кислота	аспарагиновая кислота	орнитин
Контроль (без преинкубации, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2)	5,7±0,2	9,5±0,4	11,2±0,2
Преинкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2 , инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	9,5±0,7	15,4±0,5	16,7±0,2
Преинкубация 60 мин в атмосфере воздуха, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	2,0±0,3	3,8±0,4	5,2±0,5
Преинкубация и инкубация в атмосфере воздуха по 60 мин	1,3±0,3	1,7±0,2	3,4±0,1
Преинкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2 с циклогексимидом, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	5,5±0,2	9,1±0,7	10,7±0,8
Преинкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2 с актиномицином «Д», инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	5,0±0,5	8,7±0,4	10,4±0,7
Преинкубация 60 мин в атмосфере воздуха с АТФ, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	3,0±0,1	5,5±0,7	6,8±0,6
Преинкубация 60 мин в атмосфере воздуха с НАД, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	2,4±0,4	5,6±0,5	6,5±0,7
Преинкубация 60 мин в атмосфере воздуха с АТФ+НАД, инкубация 60 мин в атмосфере O_2+CO_2	4,2±0,7	6,8±0,4	8,2±0,4

Таблица 2

Влияние различных парциальных давлений кислорода на утилизацию
аминокислот в срезах коркового слоя почек
Средние данные из 6 опытов

Условия опыта	Содержание аминокислот в мкмольх/г ткани или мл инкубированной среды					
	Среда			Ткань		
	глутамино- вая кислота	аспарагино- вая кислота	орнитин	глутамино- вая кислота	аспарагино- вая кислота	орнитин
Контроль до инкубации				6,9±0,2	1,7 ±0,1	1,6±0,2
Инкубация 60 мин в атмосфере O ₂ +CO ₂ , без преинкубации:						
а) контроль	0,75±0,01	0	0	2,0±0,2	0,75±0,02	0,45±0,01
б) глутаминовая кислота	5,2 ±0,4	0,4 ±0,01	0	6,1±0,1	1,1 ±0,1	0,5 ±0,015
в) аспарагиновая кислота	2,1 ±0,1	3,85±0,3	0	4,0±0,5	2,3 ±0,2	0,5 ±0,01
г) орнитин	1,25±0,1	0,6 ±0,01	3,6±0,2	3,8±0,2	1,6 ±0,2	3,2 ±0,2
Преинкубация и инкубация по 60 мин в атмосфере O ₂ +CO ₂ :						
а) контроль	0,64±0,01	0	0	2,3±0,1	0,75±0,015	0,5±0,01
б) глутаминовая кислота	2,8 ±0,1	0,3±0,01	0	5,5±0,3	1,12±0,01	0,2±0,01
в) аспарагиновая кислота	1,25±0,1	2,6±0,1	0	3,6±0,2	2,0 ±0,1	0,3±0,01
г) орнитин	0,95±0,01	0,5±0,01	2,5±0,2	3,7±0,3	1,3 ±0,1	2,0±0,1
Преинкубация в атмосфере воздуха и инкубация в атмосфере O ₂ +CO ₂ :						
а) контроль	1,2±0,01	0,5±0,01	0,4±0,01	1,2±0,01	0,6 ±0,01	0,4±0,01
б) глутаминовая кислота	6,8±0,3	0,5±0,01	0,45±0,01	5,8±0,3	0,75±0,01	0,5±0,01
в) аспарагиновая кислота	1,7±0,2	6,1±0,1	0,5±0,015	2,5±0,2	2,2 ±0,3	0,4±0,015
г) орнитин	1,3±0,1	0,6±0,1	6,4±0,2	2,0±0,2	1,0 ±0,2	3,0±0,4

Таблица 3

Влияние различных условий преникубации на поглощение кислорода срезами коркового слоя почек в присутствии аминокислот. Средние данные из 5 опытов

Условия опыта	Количество поглощенного кислорода в $\mu\text{кл}/0,2 \text{ г}$ ткани/час		
	без преникубации в атмосфере кислорода	После преникубации	
		в атмосфере кислорода	в атмосфере воздуха
Глутаминовая кислота	$58,5 \pm 5,5$	$91,0 \pm 8,6$	$21,5 \pm 2,5$
Аспарагиновая кислота	$95,0 \pm 7,0$	$152,0 \pm 12,5$	$37,8 \pm 4,5$
Орнитин	$142,0 \pm 11,1$	$208,0 \pm 14,1$	$64,2 \pm 6,7$

почек за счет усиления окисления эндогенных ресурсов (аминокислоты, жирные кислоты) создается высокий уровень энергетического состояния почечных клеток, при котором обеспечивается не только сохранение исходного уровня активности аминокислотдеаминирующих ферментов, но и стимулируется их синтез de novo, как это показывают вышеприведенные данные. При преникубации же срезов почек в атмосфере низкого парциального давления кислорода (воздух) в результате снижения тканевого дыхания понижается также уровень энергетического состояния клеток. По-видимому, в этих условиях не обеспечивается образование достаточного количества богатых энергией фосфорных соединений, необходимых для биосинтетических реакций и в результате не только не синтезируются новые молекулы белка, но даже наступают необратимые изменения в структурном состоянии имеющихся в клетках белков (изменение конформаций, протеолиз и др.), в том числе и ферментов, участвующих в процессах деаминации аминокислот, что в конечном счете приводит к снижению их каталитической активности. Об этом свидетельствуют также результаты опытов, с применением АТФ и НАД. Как было видно, эти нуклеотиды стабилизируют ферменты, участвующие в процессах деаминации аминокислот в срезах почек. Показано, что в условиях низкого энергетического состояния клеток, наряду с многочисленными нарушениями метаболических процессов в клетках, страдают также и функции механизмов, регулирующих трансмембранный перенос ионов калия и натрия, в результате чего нарушается их баланс внутри клетки (повышение содержания натрия и снижение калия), что вместе с продуктами распада белков (в результате протеолиза) вызывает повышение внутриклеточного осмотического давления и набухание клеток. Это приводит к изменению физико-химического состояния клеточных мембран (натяжение и разрыв мембран, изменение структурного состояния компонентов, входящих в состав мембран и др.), играющих важную роль в регуляции деаминации аминокислот в почечных клетках (1). Об этом свидетельствует и наблюдаемый нами другой интересный факт: когда срезы почек сохраняются в холодных условиях (+4 +5 С) в атмосфере воздуха в течение 2–3 часов и даже

больше, аминокислотдеаминирующая способность ферментов сохраняется на высоком уровне, но если они инкубируются в атмосфере воздуха в течение одного часа при $t = -37^{\circ}\text{C}$, то отмечается резкое снижение активности этих ферментов, как это было видно из вышеприведенных данных. В условиях низкой температуры клеточный метаболизм подавляется до минимального уровня, протеазы не функционируют, состояние аминокислотдеаминирующих ферментов сохраняется почти на уровне свежих тканей, между тем, как в условиях оптимальной температуры ($+37^{\circ}\text{C}$) и отсутствия высокого содержания кислорода создаются условия для действия протеназ и других метаболических нарушений, приводящих к распаду белков, в том числе и ферментов, участвующих в процессах окислительного деаминирования аминокислот. По-видимому, для живой клетки энергия нужна не только для осуществления биосинтетических, транспортных, осмотических и других процессов, но и для сохранения нормальной конформации биологически активных соединений, в частности, белков. Не исключена возможность, что макроэргические фосфорные соединения, а также и НАД оказывают подавляющее действие на активность протеназ.

Наблюдаемое явление представляет большой теоретический и практический интерес и заслуживает всестороннего дальнейшего изучения.

Ժ. Ս. ԿԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Թրվածնի տարրեր պարցիալ ճնշումների ազդեցությունը որոշ ամինաթթուների դիամինացման ինտենսիվության վրա երիկամի կեղևային շերտում

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների երիկամի կեղևային շերտի կտրվածքների վրա թթվածնի տարրեր պարցիալ ճնշման պայմաններում:

Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ թթվածնի բարձր պարցիալ ճնշման պայմաններում զգալիորեն խթանվում է որոշ ամինաթթուների գեամինացումը, իսկ ցածր ճնշման ժամանակ՝ ճնշվում է:

Ամինաթթուների յուրացումն երիկամի կտրվածքների կողմից թթվածնի բարձր պարցիալ ճնշման պայմաններում, ի տարբերություն ցածր ճնշմանը, բնթանում է մեծ ինտենսիվությամբ, որը ներդաշնակում է հյուսվածքային շնչառության և ամիակազոյացման տվյալների հետ:

Ստացված տվյալների հիման վրա կարելի է դալ այն եզրակացություն, որ թթվածնի բարձր պարցիալ ճնշման դեպքում էնդոպենոնետուրսների օքսիդացման ուժեղացման շնորհիվ, ստեղծվում է երիկամային թշիչների էներգետիկ բարձր մակարդակ, որի բնթացքում ոչ միայն պահպանվում է ամինաթթուները դիամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունը, այլև խթանվում է նրանց սինթեզը de novo:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ H. A. Krebs, Biochem. J., 29, (7), 1620 (1935). ² A. E. Браунштейн, Р. М. Азарх, Биохимия, 9, № 6, 337 (1944). ³ Г. X. Бунятян, А. С. Оганесян, Ж. С. Геворкян, ДАН СССР, т. 177, № 4, 951 (1967). ⁴ Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян, К. Д. Беджаниян, ДАН Арм. ССР, т. 62, № 1 (1976).