

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АДЕНИЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС

Ц. М. НЕРСИСЯН, М. Г. КОЧАРЯН, А. В. АРУТЮНЯН

Выявлены существенные различия в ферментативных процессах дезаминирования АМФ в корковом и мозговом слоях почечной ткани при действии ряда эффекторов: АТФ, ионов калия и гексокиназы. Непосредственное дезаминирование АМФ в корковом слое почек в отличие от мозгового наблюдается только в присутствии АТФ. Ионы калия и гексокиназа стимулируют АМФ-дезаминазную активность мозгового слоя, но не влияют на нее в корковом слое почек.

Целью настоящей работы явилось исследование некоторых сторон регуляции АМФ-дезаминазной активности почек, а также сравнительное изучение интенсивности процессов дезаминирования ряда адениловых соединений в мозговом и корковом слоях почечной ткани.

Материал и методика. Ткань гомогенизировали в четырехкратном объеме 0,25 М сахарозы, содержащей 50 мМ трис-НСI буфера (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА и 0,0018 М СаСl₂. Полученный гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге VAC-601 при 0—4° по методу Хогебума и Шнейдера [1]. Ядерную фракцию, которую отделяли при 900 г в течение 10 мин, очищали путем многократного промывания и центрифугирования в растворе сахарозы, содержащем 0,0018 М СаСl₂, в градиенте плотности сахарозы 0,35; 0,5; 0,7 М при 1200, 2000 и 9000 г соответственно. Митохондрии осаждали при 18000 г в течение 20 мин. Из полученной надосадочной жидкости выделяли микросомы при 105000 г в течение 60 мин. Таким образом, АМФ-дезаминазная активность определялась нами в четырех фракциях: ядрах, митохондриях, микросомах и гналоплазме (растворимая фракция). Растворимую фракцию концентрировали с помощью сефадекса G-25. В отдельных опытах использовали растворимую фракцию, полученную путем центрифугирования гомогената мозгового и коркового слоев почечной ткани.

В качестве добавок использовали АМФ, АДФ и аденозин в количестве 5 мкмоль/мл, АТФ—2 мкмоль/мл, кристаллическую дрожжевую гексокиназу (ГК)—0,33 мг/мл, КСI—50 мкмоль/мл. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37° в 0,2 М трис-НСI буфере (рН 7,0).

Аммиак определяли микродиффузионным методом в модификации Силаковой и сотр. [2], белок—методом Лоури [3], неорганический фосфат (Ф_п)—методом Лоури и Лопеса, видоизмененным Пилом и Лохманом [4].

Результаты и обсуждение. Данные относительно внутриклеточного распределения АМФ-дезаминазы в различных органах (мозг, печень, мышцы) свидетельствуют о локализации фермента в основном в растворимой фракции [5—9].

Однако в ряде работ показано наличие, наряду с растворимым ферментом, микросомального в скелетных мышцах [10], митохондриального и ядерного в мозге [11—13], а также фермента, связанного с мембранами, в эритроцитах человека [14] и печени [15]. В наших опытах, преследующих цель изучить локализацию АМФ-дезаминазы в почечной ткани (табл. 1), непосредственное дезаминирование АМФ отмечалось в растворимой фракции. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, в

Таблица 1

Субклеточная локализация АМФ-аминогидролазной активности почечной ткани (прирост аммиака и фосфата по сравнению с инкубированным контролем, мкмоль/10 мг белка; средние данные 6 опытов)

Субстраты	Ядра		Митохондрии		Микросомы		Гиалоплазма	
	NH ₃	Ф _{II}						
АМФ	2,1±0,3	3,5±0,3	1,4±0,1	6,9±0,6	0,6±0,02	0,8±0,03	3,3±0,3	2,4±0,2
АМФ+АТФ	2,6±0,2	12,0±1,3	1,9±0,3	10,2±0,9	0,7±0,03	1,4±0,4	5,9±0,7	5,1±0,4
АМФ+ГК	2,0±0,2	4,3±0,4	1,7±0,2	7,4±0,7	0,3±0,01	0,7±0,02	3,4±0,2	3,1±0,3
АТФ	—	5,8±0,6	—	2,9±0,2	—	—	0,7±0,02	4,1±0,3

ядерной и митохондриальной фракциях образование аммиака сопровождается интенсивным дефосфорилированием АМФ. Во фракции микросом отмечалась весьма низкая АМФ-дезаминазная и АМФ-фосфогидролазная активность. Причем во всех трех фракциях такие эффективные активаторы АМФ-аминогидролазы, как АТФ и ГК, не вызывали заметного увеличения образования аммиака из АМФ. Из той же таблицы следует, что в растворимой фракции имеет место прирост аммиака и фосфата из АМФ, по сравнению с инкубированным контролем. Активность АМФ-дезаминазы в этой фракции возрастает в присутствии АТФ—аллостерического активатора фермента из разных животных тканей [13, 16—18]. Количество аммиака, образованного из АМФ в присутствии АТФ, более чем в 5 раз превосходит продукцию фосфата по сравнению с контрольными пробами, содержащими только АТФ (5,2 мкм аммиака соответствует 1 мкм фосфата). Между тем, во фракциях ядер, митохондрий и микросом в присутствии АТФ дефосфорилирование АМФ значительно превалирует над его дезаминированием. Как и в этих фракциях, ГК не оказывает влияния на продуцирование аммиака из АМФ в растворимой фракции. Попытка ингибировать процесс дефосфорилирования АМФ с помощью ЭДТА не увенчалась успехом, так как добавление его приводит не только к подавлению АМФ-фосфогидролазной активности, но и вызывает существенное ингибирование продукции аммиака из АМФ.

В последующих экспериментах мы изучали АМФ-дезаминазную активность почечной ткани в зависимости от рН среды (табл. 2). Оптимум действия АМФ-дезаминазы в мышечной ткани различных животных, в зависимости от буферной среды, в которой определялась активность фер-

Таблица 2

Динамика образования NH_3 и Ф_Π в растворимой фракции почек крыс в зависимости от pH (прирост NH_3 и Ф_Π по сравнению с инкубационным контролем, $\mu\text{кмоль}/10$ мг белка; средние данные 8-ми опытов)

Субстрат	Буфер—имидазол-HCl						Буфер трис-HCl							
	pH 6,2		pH 6,6		pH 7,0		pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0		pH 8,5	
	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π	NH_3	Ф_Π
АМФ	$3,3 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,3$
АМФ+АТФ+К	$6,7 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,7$	$8,8 \pm 0,8$	$6,8 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,4$
АТФ+К	$1,2 \pm 0,09$	$8,2 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,02$	$7,2 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,8$

Таблица 3

Образование аммиака и фосфата из АМФ, АДФ и аденозина в растворимой фракции коркового и мозгового слоев почек крыс (прирост аммиака и фосфата по сравнению с инкубированным контролем, $\mu\text{кмоль}/10$ мг белка; средние данные 8-ми опытов)

Корковый слой

	АМФ	АМФ+АТФ	АМФ+ГК	АМФ+К	Аденозин.	Аденозин +АТФ	АТФ	АДФ
NH_3	$3,7 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,4$	—	$3,2 \pm 0,3$
Ф_Π	$3,9 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$	—	$3,7 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$

Мозговой слой

NH_3	$16,0 \pm 1,2$	$22,5 \pm 1,6$	$22,5 \pm 1,5$	$24,0 \pm 1,3$	$16,0 \pm 1,0$	$16,5 \pm 1,2$	—	$10,5 \pm 0,9$
Ф_Π	$6,5 \pm 0,6$	$10,5 \pm 0,8$	$8,5 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,4$	—	$8,5 \pm 0,9$	$8,5 \pm 0,7$	$13,5 \pm 1,3$

мента, проявляется при рН 5,9—6,5 [19—21]. Оптимум действия мозгового фермента [13] и фермента из печени крыс [22] оказался более высоким (6,9—7,1). Из всех испытанных значений рН в наших опытах с почечной тканью наиболее заметное образование аммиака из АМФ отмечалось при рН 7,0 в трис-НСI буфере. Несколько ниже была продукция его при том же значении рН в буферной среде имидазол-НСI. Добавленные АТФ и ионы калия повышают продукцию аммиака, а количество фосфата остается минимальным (о дезаминировании интактной молекулы АМФ судили по соотношению количества аммиака и неорганического фосфата в пробах с добавленными АМФ, АТФ и ионами калия в контрольных пробах, содержащих АТФ+К⁺).

В связи с полученными результатами представлял интерес вопрос о сравнительном изучении аммиакообразования из АМФ в корковом и мозговом слоях почек крыс при добавлении различных эффекторов АМФ-дезаминазы. Было также исследовано дезаминирование аденозина в этих слоях почечной ткани.

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что в растворимой фракции коркового слоя почек дезаминирование АМФ сопровождается его интенсивным дефосфорилированием. Однако при добавлении АТФ в пробы с АМФ наблюдается непосредственное дезаминирование последнего, при этом образуется 4,7 мкМ аммиака и 5,6 мкМ фосфата, причем 3,5 мкМ фосфата — за счет дефосфорилирования самого АТФ. Следовательно, в присутствии АТФ из АМФ образуется 4,7 мкМ аммиака и 2,1 мкМ фосфата. Эти данные свидетельствуют о том, что АМФ-дезаминазная активность коркового слоя почек проявляется только при наличии АТФ. Изучение растворимой фракции мозгового слоя почек в этом аспекте показало (табл. 3), что из АМФ образуется 16 мкМ аммиака и 6,5 мкМ фосфата на 10 мг белка, что свидетельствует о значительно более высокой АМФ-дезаминазной активности в этом слое почек крыс по сравнению с корковым. При добавлении АТФ интенсивность дезаминирования АМФ возрастает, при этом большая часть фосфата образуется за счет дефосфорилирования АТФ.

Многочисленные исследования посвящены вопросам регуляции АМФ-дезаминазы. Наряду с АТФ и другими нуклеотидами, в этом процессе принимают участие одновалентные катионы: литий, калий, натрий и т. д. [21, 23, 24]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что препараты очищенной дрожжевой гексокиназы стимулируют образование аммиака из АМФ в мозговой и мышечной тканях [25, 26]. Наши данные о влиянии ионов калия и гексокиназы на образование аммиака из АМФ в корковом и мозговом слоях почек свидетельствуют о существенных различиях в регуляции активности АМФ-дезаминазы. В корковом слое (табл. 3) эти эффекторы не оказывают активирующего влияния на фермент, дезаминирующий АМФ, в мозговом же слое заметно активируют его. Из табл. 3 видно также, что аденозин интенсивно дезаминируется в обоих слоях почек, причем АТФ не действует на этот процесс, а АДФ не подвергается непосредственному дезаминированию, так как количество фосфата превосходит продукцию аммиака из добавленного

АДФ. По данным Оганесяна и сотр. [27], интенсивность дезаминирования АМФ в срезах мозгового и коркового слоев почек одинакова, тогда как аденозин в мозговом слое дезаминируется значительно слабее, чем в корковом. Из наших экспериментов явствует, что оба ферментативных процесса в растворимой фракции мозгового слоя протекают более интенсивно, чем в корковом слое. Исходная АМФ-дезаминазная активность растворимой фракции мозгового слоя не только выше таковой в корковом слое, но и четко отличается от нее в отношении чувствительности к ряду эффекторов. Эти данные представляют интерес в связи с установленным в литературе фактом существования изоферментов АМФ-дезаминазы в различных животных тканях [13, 28—30]. Результаты исследований Огасавара и сотр. свидетельствуют о том, что в почках, в отличие от других органов (мозг, легкие, селезенка), присутствует единственная молекулярная форма АМФ-дезаминазы [29], которая не подвержена активирующему влиянию АТФ [30]. В то же время другими исследователями установлено, что последний является весьма эффективным активатором почечного фермента [31].

На основании проведенных нами исследований можно допустить наличие в растворимой фракции почечной ткани двух форм АМФ-дезаминазы, отличающихся уровнем исходной активности и чувствительностью к АТФ и другим активаторам. Присутствие менее активной формы АМФ-дезаминазы в корковом слое, возможно, обусловлено существованием в нем дезаминаз L-аминокислот, обеспечивающих их непосредственное дезаминирование [27]. Одним из важных ферментов, участвующих в этом цикле и ответственных за образование аммиака из аминокислот при участии деаминоформы АМФ—ИМФ, является АМФ-дезаминаза. Не исключена возможность, что в мозговом слое почек, в котором отсутствуют дезаминазы L-аминокислот, при наличии высокой АМФ-дезаминазной активности образование аммиака из аминокислот в цикле пурипнуклеотидов приобретает важное значение.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 17.II 1978 г.

**ԱԳԵՆԻՎԱՅԻՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԴԵԱՄԻՆԱՑՈՒՄԸ
ԱՌՆՏՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱՍԹՈՒՄ**

Մ. Մ. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ, Մ. Գ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է ԱՄՖ-դեամինազայի ակտիվությունը երիկամային չյուսվածքում: ԱՄՖ-դեամինազայի ակտիվությունը տեղակայված է լուծելի ֆրակցիայում և օպտիմում pH 7: Երիկամի կեղևային շերտի լուծելի ֆրակցիայում ԱՄՖ-ը դեամինացվում է միայն ԱՏՖ-ի ներկայությամբ, իսկ միջուկային շերտում՝ նաև առանց ԱՏՖ-ի: Սակայն վերջինիս ներկայությամբ ԱՄՖ-ամինահիդրոլազայի ակտիվությունը ավելի է բարձրանում:

Հեքսոկինազան և K-իոնները շին ազդում երիկամի կեղևի լուծելի ֆրակցիայի ԱՄՖ-դեամինազայի ակտիվության վրա, սակայն զգալիորեն խթանում են վերջինիս ակտիվությունը միջուկային շերտի լուծելի ֆրակցիայում:

Աղհնողինը դեամինացվում է երիկամի 2 շերտերում էլ, ԱԴՖ-ի դեամինացումն ուղեկցվում է նրա ինտենսիվ դեֆոսֆորիլացմամբ:

DEAMINATION OF ADENYLIC COMPOUNDS IN RAT KIDNEY

Ts. M. NERSISSIAN, M. G. KOCHARIAN, A. V. HAROUTJUNIAN

The AMP-deaminase activity of rat kidney has been investigated in the present paper. AMP-deaminase activity in kidney is localized in the soluble fraction and has a pH optima of 7.0. In the soluble fraction of renal cortex deamination of AMP occurs only in the presence of ATP. The production of ammonia from AMP is observed in the adrenal medullary layer without ATP, but becomes much higher in its presence. Hexokinase and K-ions have no influence on AMP-deaminase activity of renal cortex soluble fraction, but increase it to a marked degree in the soluble fraction of adrenal medullary layer.

There is a pronounced deamination of adenosine in both layers of kidney. At the same time deamination of ADP is accompanied by its intensive dephosphorylation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hogeboom G., Schneider W., Striebich M. J. Biol. Chem., 196, 111, 1952.
2. Силакова А. И., Труш Г. П. и Являкова Я. А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
3. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 255, 1951.
4. Peel L., Loughman B. Biochem., J., 65, 709, 1957.
5. Zydowo M. Nature, 184, 1641, 1959.
6. Pur zyska J. Acta Biochim. Polon., 9, 83, 1962.
7. Мальшова М. К. и Полякова Н. М. Укр. биохим. журн., 37, 360, 1965.
8. Smith L., Kyzes D. Feder. Proc., 27, 3241, 1968.
9. Арутюнян А. В. и Нерсисян Ц. М. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 6, 39, 1970.
10. Abood L., Romancheck L. Exptl. Cell. Res., 8, 459, 1959.
11. Полякова Н. М. и Мальшова М. К. Укр. биохим. журн., 33, 713, 1961.
12. Бунятян Г. Х. и Арутюнян А. В. ДАН АрмССР, 46, 87, 1968.
13. Ogasawara N., Yoshino M., Kawamura Y. Biochim. Biophys. Acta, 258, 680, 1972.
14. Rao S., Hara L., Askari A. Biochim. Biophys. Acta, 151, 651, 1968.
15. Lee J., Wang M. J. Biol. Chem., 243, 2260, 1968.
16. Askari A. Nature, 202, 185, 1964.
17. Setlow B., Lowenstein J. J. Biol. Chem., 243, 3409, 1968.
18. Smith L., Kyzer D. Biochim. Biophys. Acta, 191, 415, 1969.
19. Lee Y. J. Biol. Chem., 227, 999, 1957.
20. Ronga-Testoni S., Ranleri M., Raggi A., Ronca G. Ital. J. Biochem., 19, 262, 1970.
21. Zielke C., Suelter C., J. Biol. Chem., 246, 1313, 1971.
22. Kizer D., Cox B., Lovig C., De Estrugo S. J. Biol. Chem., 238, 3048, 1963.
23. Ronga-Testoni S., Raggi A., Ronca G. Biochim. Biophys. Acta, 198, 101, 1970.
24. Ashman L., Atwell J. Biochim. Biophys. Acta, 258, 618, 1972.

25. Арутюнян А. В. Тез. V Всесоюзн. конф. по нейрохимии, 112, Тбилиси, 1969.
26. Buntalan H., Haroutunian A. J. Neurochem., 18, 859, 1971.
27. Оганесян А. С., Григорян Д. З. Биологический журнал Армении, 23, 10, 98, 1970.
28. Арутюнян А. В. и Ловенштейн Дж. М. ДАН СССР, 234, 951, 1977.
29. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. FEBS, Letter, 44, 63, 1974.
30. Ogasawa N., Goto H., Watanabe T., Kawamura Y. and Yoshino M. Biochem. Biophys. Acta, 364, 353, 1974.
31. Setlow B., Burger R., Lowensteln J. J. Biol. Chem., 241, 1244, 1966.