

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

А. С. Оганесян, Ж. С. Геворкян, И. Р. Фаталова

Влияние альфа-кетоглутаровой кислоты на образование аммиака из L-аминокислот в корковом слое почек белых крыс

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 23/VII 1971)

Почки с мочой выделяют довольно большое количество аммиака (у взрослого человека в норме 510—850 мг в сутки). Установлено, что при ацидозе усиливается его экскреция, а при алкалозе, наоборот, подавляется. Ряд авторов (1, 2) считает, что процессы глюконеогенеза в почечной ткани регулируют аммиакообразование в ней путем изменения активности глутаминазы I. Показано, что при ацидозе усиливается образование глюкозы из альфа-кетоглутаровой кислоты (α -КГЛ) в почках, в результате чего ускоряется метаболическое превращение глутаминовой кислоты, приводящей к понижению ее концентрации в почечной ткани, которая как известно является ингибитором глутаминазы I (2). Уменьшение содержания глутаминовой кислоты приводит к деингибированию глутаминазы I почечной ткани и усилению образования аммиака из глутаминна. Установлено, что 50—60% аммиака мочи образуется из глутаминна, а остальная часть—из аминокислот. С другой стороны, было показано, что при введении α -КГЛ экспериментальным животным, наблюдается значительное уменьшение выделения аммиака с мочой и повышение содержания α -КГЛ и глутаминовой кислоты в почках (3). Авторы считают, что наблюдаемое явление можно объяснить подавлением глутаминазы I, в результате повышения содержания глутаминовой кислоты. Наши прежние исследования (1, 4) показали, что в корковом слое почек наряду с глутамином, источником аммиака является также и ряд L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая кислоты, орнитин и др.). Нами также было показано, что α -КГЛ в присутствии фосфата не оказывая влияния на активность глутаминазы I, значительно подавляет образование аммиака из L-глутаминовой кислоты в срезах почек (5).

Имея в виду вышесказанное, мы предполагали, что α -КГЛ, по-видимому, в основном регулирует образование аммиака из L-аминокислот.

Для выяснения этого вопроса, мы проводили сравнительные исследования по влиянию этой кетокислоты на образование аммиака из L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и из L-орнитина в срезах коркового

слоя почек белых крыс, а также из глутамина в срезах и гомогенатах коры почек этих животных.

Срезы почечной ткани (по 200 мг) инкубировали в Krebs-Рингер-би-карбонатном буфере, рН—7,4, при 1—37°C, в течение одного часа. На каждую пробу добавляли аминокислоты по 16 мкМ. Количество α-КГЛ варьировалось, как указано в таблицах. Аммиак определяли по микро-диффузионному методу Конве.

Таблица 1
Влияние α-КГЛ на диурез и выделение аммиака с мочой у белых крыс

№ опы- тов	Количество мочи в миллилитрах (за 24 часа)			Количество аммиака в мкмольях (за 24 часа)		
	контроль	α-КГЛ 15 мг	α-КГЛ 30 мг	контроль	α-КГЛ 15 мг	α-КГЛ 30 мг
1	2,5	2,7	4,8	69,1	54,5	39,0
2	2,3	2,8	3,9	67,6	52,7	35,5
3	1,5	2,4	3,2	60,5	38,1	24,8
4	2,0	2,7	3,8	73,5	50,8	37,0

Как видно из табл. 1, при введении α-КГЛ крысам (внутрибрюшинно) наблюдается значительное понижение количества выделенного с мочой аммиака, причем это явление наблюдается до определенного предела, приблизительно 50% контрольной величины. Интересно отметить, что большие дозы α-КГЛ в начале своего действия вызывают значительное повышение диуреза, что, по-видимому, связано с усилением фильтрационной способности почек.

Таблица 2
Влияние α-КГЛ на образование аммиака (в мкмольях/г ткани/час) из L-аминокислот в срезах и гомогенатах коркового слоя почек

№ опытов	Количество добавленного α-КГЛ	С р е з ы								Гомогенат	
		контроль				+α-КГЛ				глутамин	глутамин + α-КГЛ
		глутамино- вая кисло- та	аспарагин- новая кис- лота	орнитин	глутамин	глутамино- вая кисло- та	аспарагин- новая кис- лота	орнитин	глутамин		
1	0,375 мг/мл	5,6	10,0	12,0	27,0	2,7	7,8	11,6	26,8	22,3	22,0
2	0,375 .	5,2	9,7	9,0	24,0	3,2	7,0	11,0	24,7	26,7	28,0
3	0,375 .	6,1	8,9	10,3	22,5	2,7	5,7	10,5	24,0	23,2	23,8
4	0,375 .	5,4	9,3	11,6	—	3,0	8,1	12,0	—	—	—
5	0,75 .	6,8	11,0	14,4	30,7	1,3	8,1	11,0	26,4	26,4	25,0
6	0,75 .	6,2	9,7	11,0	23,3	2,2	7,3	10,3	19,8	23,5	24,4
7	0,75 .	5,9	11,2	9,4	—	1,8	5,4	9,9	—	—	—
8	1,5 .	6,6	10,9	12,0	27,0	0	2,8	11,0	23,7	29,1	28,5
9	1,5 .	5,7	10,0	10,9	26,0	0	2,1	9,0	23,0	24,2	24,0
10	1,5 .	5,6	8,7	9,7	24,0	0	0	8,1	20,1	26,4	25,3
11	1,5 .	4,3	6,0	8,3	33,0	0	0	5,7	27,0	—	—

Результаты исследований (табл. 2) показывают, что в контрольных опытах срезы почек в присутствии L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и L-орнитина продуцируют большое количество свободного аммиака. Приведенные данные показывают, что α -КГЛ оказывает подавляющее действие на образование аммиака из этих аминокислот. Однако различные концентрации этой кетокислоты вызывают неодинаковое влияние на образование аммиака из различных L-аминокислот.

Малые количества (0,375 мг/мл) α -КГЛ значительно подавляя деаминирование L-глутаминовой кислоты, не оказывают влияния на деаминирование L-орнитина. Процессы же образования аммиака из L-аспарагиновой кислоты при этом ингибируются в сравнительно меньшей степени, чем из L-глутаминовой кислоты. С повышением концентрации α -КГЛ наблюдается более выраженное торможение деаминирования L-глутаминовой кислоты. Так, например, при добавлении 1,5 мг/мл α -КГЛ, образование аммиака из L-глутаминовой кислоты полностью прекращается. В этих концентрациях α -КГЛ сильно ингибирует также и деаминирование L-аспарагиновой кислоты (иногда до полного прекращения образования аммиака). С повышением концентрации α -КГЛ наблюдается подавление деаминирования также и L-орнитина. Однако ингибирующее действие α -КГЛ в отношении орнитина слабое. В то время, как при наличии в инкубируемой среде 1,5 мг/мл α -КГЛ, образование аммиака из L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислот подавляется почти полностью, деаминирование же L-орнитина ингибируется от 8 до 32%. Из этой же таблицы видно, что α -КГЛ в срезах почек подавляет образование аммиака из глутаминна, а в гомогенате почечной ткани этого не наблюдается. Некоторый ингибирующий эффект α -КГЛ на образование аммиака из глутаминна в срезах почек объясняется его действием на деаминирование глутаминовой кислоты, образовавшаяся из глутаминна при гидролитическом расщеплении его. В гомогенатах коркового слоя почек, где глутаминовая кислота не деаминируется и не дает прироста аммиака, а активность глутаминазы довольно высокая, α -КГЛ не оказывает подавляющего влияния на ее активность. Неодинаковый эффект α -КГЛ на образование аммиака из различных аминокислот проявляется также и при ее внутривенном введении.

Приведенные данные показывают, что под действием α -КГЛ как *in vivo* так и *in vitro* наблюдается значительное подавление продукции аммиака в почках и выделение его с мочой. Однако эта кетокислота проявляет неодинаковое влияние на образование аммиака из различных источников.

Опыты, проведенные *in vitro* показывают, что под действием этой кетокислоты образование аммиака из L-аминокислот подавляется в значительной степени, а из глутаминна, который является основным источником аммиака мочи, образование его почти не изменяется. Отсутствие подавляющего эффекта α -КГЛ на активность глутаминазы ! (в присутствии фосфата) указывают и другие авторы (7⁵). Квам и сотр. (8) показа-

ли, что в отсутствие неорганического фосфата α -КГЛ в очищенных препаратах повышает активность глутаминазы I. Активность глутаминазы II в почках низкая, поэтому в процессах продукции аммиака в почках она не играет существенной роли.

Известно, что 50–60% аммиака мочи образуется из глутамина, а остальное количество — из различных аминокислот. Результаты наших исследований показывают, что α -КГЛ понижает выделение аммиака с мочой до определенного уровня. Подобное явление наблюдалось в опытах Балагура-Баруха и сотр. (4). Эти данные дают нам основание полагать, что наблюдаемое уменьшение выделения аммиака с мочой под действием α -КГЛ идет за счет подавления процессов образования аммиака из L-аминокислот. По-видимому, в физиологических условиях α -КГЛ играет важную роль в процессах регуляции образования аммиака в почках и его выделения с мочой. Надо полагать, что и в *in vivo* условиях под действием α -КГЛ образование аммиака из глутамина не изменяется.

Следует отметить особую важность подавляющего действия α -КГЛ на деаминирование L-аминокислот и отсутствие подобного влияния на продукцию аммиака из глутамина. Таким путем продукт деаминирования глутаминовой кислоты — α -КГЛ (который в почечной ткани образуется в достаточном количестве) с одной стороны подавляет деаминирование глутаминовой кислоты (также и аспарагиновой кислоты), способствуя сохранению гомеостаза в отношении этих аминокислот, а с другой стороны, не оказывая влияния на активность глутаминазы I (и как кетокислота повышая активность глутаминазы II) способствует выделению аммиака из организма.

Мы применяли сравнительно большие концентрации α -КГЛ, что не встречается в живом организме. Однако, в физиологических условиях ткани (ферментные системы) проявляют высокую реактивность в отношении различных факторов, поэтому не исключена возможность, что в *in vivo* условиях незначительные количества α -КГЛ оказывают соответствующее воздействие на процессы аммиакообразования из L-аминокислот.

Активность глутаминазы I, по-видимому, изменяется в редких случаях, когда в тканях организма образуется большое количество глутамина и возникает необходимость усиления его расщепления и выведения аммиака из организма. Известно, что активность глутаминазы I повышается при ацидозе и подавляется при алкалозе.

Каков механизм подавляющего действия α -КГЛ на деаминирование упомянутых L-аминокислот? Известно, что путем реаминирования и с участием дегидрогеназы глутаминовой кислоты α -КГЛ может связывать образовавшийся аммиак и тем самым понизить его количество. Однако, опыты показывают, что в срезах почек этим путем может связываться незначительное количество аммиака, что не может объяснить такое выраженное торможение образования аммиака в почечной ткани из L-аминокислот и подавление его выделения с мочой под действием α -КГЛ. Об этом говорят и результаты опытов с орнитинем, когда малые concentra-

дин α -КГЛ не оказывая влияния на образование аммиака из этой аминокислоты подавляют деаминирование глютаминовой кислоты примерно на 50%, к тому же в пробах с орнитинем образуется большое количество аммиака.

В почечной ткани добавленный α -КГЛ трансаминируясь с другими аминокислотами превращается в глютаминовую кислоту повышая ее содержание. В этих условиях надо было ожидать подавление активности глютаминазы I и образование аммиака из глютамина. Однако в наших опытах этого не наблюдалось. С другой стороны повышение содержания глютаминовой кислоты должно было привести к усилению образования аммиака из самой глютаминовой кислоты, так как она хорошо деаминируется в почечной ткани (срезы). Эти вопросы требуют дополнительных исследований.

Результаты наших исследований дают нам основание полагать, что в почечной ткани α -КГЛ, L-глютаминовая и L-аспарагиновая кислоты конкурируют за деаминирующий механизм и в зависимости от их концентрации в инкубируемой среде в соответствующей мере проявляется тормозящий эффект α -КГЛ на аммиакообразование из L-аминокислот.

Малые концентрации α -КГЛ преимущественно подавляют образование аммиака из L-глютаминовой кислоты и в меньшей мере из L-аспарагиновой кислоты, не оказывая влияния на деаминирование L-орнитина. Сравнительно высокие концентрации этой кетокислоты подавляют образование аммиака также из L-орнитина.

В присутствии α -КГЛ часть орнитина по орнитин- α -КГЛ трансаминазному пути превращается в глютаминовую кислоту; в этих условиях также надо было ожидать усиление аммиакообразования так как глютаминовая кислота как отмечалось выше хорошо деаминируется в срезах коркового слоя почек, однако, этого не наблюдается. Надо полагать, что и здесь мы имеем дело с подавлением процесса деаминирования L-глютаминовой кислоты в присутствии α -КГЛ. Не исключена возможность существования конкурентных взаимоотношений и между α -КГЛ и орнитинем за деаминирующий механизм этой аминокислоты. Что касается глютамина, то наблюдаемое частичное подавление образования аммиака из него в срезах коркового слоя почек в присутствии α -КГЛ, объясняется торможением образования аммиака из L-глютаминовой кислоты, образовавшейся при расщеплении самого глютамина. В гомогенатах почечной ткани, где глютаминовая кислота не подвергается деаминированию, α -КГЛ не проявляет подавляющего эффекта.

При добавлении α -КГЛ к гомогенатам почечной ткани наблюдается значительное повышение содержания глютаминовой кислоты, между тем как активность глютаминазы I не изменяется. Поэтому трудно объяснить регуляцию процессов образования аммиака из глютамина только изменением содержания глютаминовой кислоты почечной ткани. Надо полагать, что существуют и другие механизмы, регулирующие образование аммиака из глютамина в почечной ткани и выделение его с мочой. В последнее время подобное мнение высказывают и другие авторы.

Результаты наших исследований с одной стороны поддерживают ранее нами высказанное мнение о существовании в почечной ткани отдельных механизмов деаминации L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и L-орнитина, а с другой — показывают, что образовавшийся в почечной ткани α -КГЛ (возможно и в других тканях) принимает участие в регуляции деаминации L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислот, и тем самым способствует поддержанию гомеостаза в отношении этих аминокислот. Исследования по изучению механизмов деаминации L-аминокислот в почечной ткани продолжаются.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ժ. Ս. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ի. Ռ. ՆԱԹԱՍՅԱՆ

Ալֆա-կետոգլյուտարատի ազդեցությունը սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային շերտում L-ամինաթթուներից ամիակի առաջացման վրա

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների վրա *in vivo* և նրանց երիկամների կեղևի կտրվածքների և հոմոգենատների վրա:

Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ ալֆա-կետոգլյուտարատի (α -ԿԳԼ) ներորոգյալնամպային ներարկման դեպքում ամիակի արտադրումը մեկի միջոցով խիստ նվազում է: α -ԿԳԼ փոքր քանակները դրախորեն ձնչում են ամիակի առաջացումը L-գլյուտամինաթթվից, ազդեցություն չունենալով L-օրնիտինի դեամինացման վրա. այդ պայմաններում ամիակի առաջացումը L-ասպարազինաթթվից, գլյուտամինաթթվի համեմատությամբ, ձնչվում է ավելի թույլ չափով: α -ԿԳԼ քանակի մեծացման դեպքում, լրիվ ձնչվում է գլյուտամինաթթվի և ասպարազինաթթվի դեամինացումը, իսկ օրնիտինի դեամինացումը ձնչվում է անհամեմատ թույլ չափով: α -ԿԳԼ ազդեցություն չի թողնում գլյուտամինի դեամինացման վրա:

Պետք է ենթադրել, որ օրգանիզմի հյուսվածքներում (առանձնապես երիկամային հյուսվածքում) առաջացած α -ԿԳԼ մասնակցում է L-ամինաթթուներից ամիակի առաջացման սրոցեսների կանոնավորմանը, հետևապես և այդ ամինաթթուների նկատմամբ հոմեոստազի պահպանմանը: Ստացված սովյալները պաշտպանում են առաջներում մեր կողմից արտահայտված այն միտքը, որ սպիտակ առնետների երիկամային հյուսվածքի կեղևային շերտում L-գլյուտամինաթթուն, L-ասպարազինաթթուն և L-օրնիտինը դեամինացման են ենթարկվում տարբեր ֆերմենտային սխեմաներով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ A. D. Goodman, R. E. Fulz a G. E. Cahill, J. Clin. invest., 45, 612 (1966).
² L. Goldstein, Ann. J. physiol., 210, 661 (1966). ³ S. Balagura-Baruch, L. M. Shurland a. I. C. Weithauer, Am. J. Physiol., 218, 1070 (1970). ⁴ Լ. Խ. Букятин, А. С. Оганесян и Ж. С. Геворкян ДАН СССР, 177, 951, 1967. ⁵ Ж. С. Геворкян Автореф. канд. дисс., Ереван, 1969. ⁶ А. С. Оганесян и Ж. С. Геворкян, ДАН АрмССР, т. 52, № 3, 165 (1971) ⁷ H. A. Krebs, Biochem. J., 29, 1951 (1935) ⁸ B. Krampe E. Tzell a. G. Svelleby, Biochem. Biophys. Res. Comm., 23 (5), 566, 1965.