ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

LXII 1976 4

УДК 591.05.01

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян, К. Д. Беджанян

Структурная организация клеточных мембран и образование аммиака из аминокислот в корковом слое почек

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буниятяном 26/II 1976)

Установлено, что наружные, а также внутриклеточные системы мембран (мембраны клеточных органелл, эндоплазматический ретикулум и др.) принимают активное участие в регуляции метаболизма клеток. Показано, что с мембранной системой клеток связано преобладающее большинство ферментов.

Клеточная мембрана имеет ассиметрическую структуру и состоит главным образом из белковых и фосфолипидных компонентов ([1–3]). По своему липидно-белковому составу наружный слой мембран отличается от внутреннего (ассиметрия), что и обуславливает их специфическую функцию.

Наши прежние исследования ([4, 5]) показали, что целостность клеточных мембран играет важную роль в регуляции дыхания и внутриклеточных метаболических процессов. По данным ряда авторов ([1, 6, 7]) в том числе и по нашим данным, в корковом слое почек *L*-аминокислоты подвергаются интенсивному деаминированию, с образованием большого количества свободного аммиака.

В последующих наших исследованиях было установлено, что при нарушении целостности клеточных мембран (гомогенизация) коркового слоя почек деаминирующая способность L-аминокислот этой ткани почти полностью исчезает. С другой стороны, было показано, что процессы деаминирования L-аминокислот в почках тесно связаны с транспортом ионов калия и натрия через неповрежденные клеточные мембраны, что указывает на существование тесной связи между наружной клеточной мембраной и биохимическими процессами, протекающими во внутриклеточных органеллах, в частности с процессами деаминирования L-аминокислот в митохондриях ([3]).

Результаты этих опытов побудили нас провести ряд исследований по изучению значения целостности структуры цитоплазматических мембран клеток коркового слоя почек и их отдельных компонентов (белковых и липидных) в процессах аммиакообразования из различных L-аминокислот. Для изучения этого вопроса применяли некоторые

протеолитические и липолитические ферменты, детергенты, а также замораживание и гомогенизирование, которые нарушают структурную организацию клоточных мембран и тем самым изменяют их функциональную деятельность.

Срезы и гомогенаты коркового слоя почек (по 200 *мг*) предварительно инкубировали в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере (2 *мл*, pH—7,4), в присутствии трипсина (12,5 *мкг/мл*), фосфолипазы «С» (33 *мкг/мл*), дезоксихолевой кислоты (200 *мкг/мл*) и тритона Х—100 (75 *мкг/мл*) в течение 60 минут при t—37°С, а затем добавляли аминокислоты (глютаминовая, аспарагиновая, орнитин и глютамин) по 16 *мкмоль* на пробу и проводили инкубацию в течение 60 минут в аэробных условиях (кислород—95%, углекислый газ—5%). Гомогенизацию почечной ткани производили в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, а замораживание срезов в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере, при t—17°С, в течение 15 минут, с последующим оттаиванием в условиях комнатной температуры. Содержание образовавшегося аммиака определяли микродиффузионным методом по Конве, с применением реактива Несслера.

Приведенные данные (табл. 1) показывают, что при преинкубации срезов почек в условиях высокого напряжения кислорода, из аминокислот образуется значительно большее количество аммиака, по сравнению с тем, когда преинкубация проводится в атмосфере низкого содержания кислорода (воздух). В присутствии трипсина и фосфолипазы «С», а также дезоксихолевой кислоты и тритона Х—100 отмечается резкое подавление образования аммиака из аминокислот. Интересно отметить, что ингибирующий эффект этих мембранноактивных агентов в более выраженной форме (в абсолютных количествах) проявляется когда преинкубация проводится в атмосфере с высоким напряжением кислорода, тем не менее в этих условиях из аминокислот образуется сравнительно больше аммиака, чем когда преинкубация проводится в условиях воздуха. Как видно из этой же таблицы, гомогенизирование, а также и замораживание срезов, приводят почти к полному исчезновению аминокислот-деаминирующей способности почечной ткани. Опыты показали (табл. 1), что образование аммиака из глютамина существенно подавляется в срезах и гомогенатах почек только под действием трипсина, остальные агенты, а также замораживание и гомогенизирование ткани, не оказывают особого влияния на этот процесс. Некоторое повышение образования аммиака из глютамина в присутствии добавленных агентов, преинкубированных в атмосфере высокого напряжения кислорода, по сравнению с опытами, преинкубированными в атмосфере воздуха, связано с более интенсивным деаминированием глютаминовой кислоты образовавшейся из глютамина. Значительное подавление аммиакообразования из глютамина в присутствии трипсина можно было объяснить его действием как на структуру клеточных мембран, так и на фермент глютаминазу (после поступления трипсина во внутрь клетки). Для выяснения этого вопроса ряд опытов проводили с гомогенатами почечной ткани (где отсутствуют мембранные барьеры). Было установлено,

что и в этих опытах трипсин в значительной мере подавляет продукцию аммиака из глютамина, что указывает на частичное инактивирование глютаминазы под действием этого протеолитического фермента.

Таблица 1

Влияние некоторых ферментов, детергентов, гомогенизации и замораживания на образование аммиака из L-аминокислот в корковом слое почек

Средние данные из 6 опытов

Условия опыта	Количество образовавшегося аммиака (в *мкмолях/г* ткани/ час) при добавлении			
	глютаминовая кислота	аспарагиновая кислота	орнитин	глютамин
1	2	3	4	5
1. Контроль (без преинкубации, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	6,1±0,2	9,4±0,3	10,8±0,2	26,8±0,7
2. Контроль (преинкубация 60*мин* в атмосфере воздуха, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	1,6±0,3	3,4±0,5	5,2±0,5	21,0±0,5
3. Контроль (преинкубация 60*мин* в атмосфере O_2+CO_2, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	9,0±0,7	16,2±0,4	17,0±0,1	28,8±0,8
4 Трипсин (преинкубация 60 *мин* в атмосфере воздуха, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	0,9±0,1	1,8±0,2	3,8±0,5	15,4±0,7
5. Трипсин (преинкубация 60 мин, в атмосфере O_2+CO_2, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	4,5±0,7	6,2±0,7	11,0±0,7	16,8±1,6
6. Фосфолипаза „С" (преинкубация 60 *мин*, в атмосфере воздуха, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	1,0±0,2	1,8±0,15	2,8±0,2	21,7±1,04
7. Фосфолипаза „С" (преинкубация 60*мин* в атмосфере O_2+CO_2 инкубация 60*мин* в атмосфере O_2+CO_2)	4,3±0,5	6,2±0,7	8,1±0,9	26,4±2,2
8. Деоксихолевая кислота (преинкубация 60 *мин*, в атмосфере воздуха, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2	0	1,9±0,2	3,4±0,4	22,5±2,9
9. Деоксихолевая кислота (преинкубация в атмосфере O_2+CO_2 60 *мин*, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	1,2±0,1	4,1±0,2	8,6±0,5	26,8±1,7
10. Тритон X—100 (преинкубация 60 *мин*, в атмосфере воздуха, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)	1,0±0,2	2,7±0,5	4,5±0,3	19,7±1,1
11. Тритон X—100 (преинкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2	3,2±0,6	4,8±0,6	12,6±0,3	25,2±1,6
12. Замораживание срезов и инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2	0,6±0,01	2,3±0,2	3,3±0,3	22,3±0,9
13. Гомогенат, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2	0	−0,6±0,01	0,7±0,01	25,9±1,5
14. Гомогенат+трипсин (преинкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2, инкубация 60 *мин*, в атмосфере O_2+CO_2)				17,4±2,1

Примечание: Опыты 1—12 проведены со срезами коркового слоя почек.

Известно, что вышеупомянутые ферменты и детергенты вызывают ряд изменений в структуре клеточных мембран. Протеолитические ферменты отщепляют отдельные пептиды из белков, а фосфолипазы— отдельные компоненты фосфолипидов, входящих в состав клеточной оболочки, вызывая соответствующие нарушения в ультраструктурной организации мембран клеток. Показано также, что детергенты связываются с мембранными белками и вызывают значительные изменения в их структуре. Эти изменения приводят к нарушению функциональной деятельности клеток, что в наших исследованиях выражалось подавлением процессов деаминирования аминокислот. Наши исследования показали, что в этих условиях активность мембранной АТФ-азы, играющая важную роль в процессах транспорта аминокислот, не претерпевает особых изменений. По всей вероятности, под действием упомянутых детергентов и ферментов, а также и замораживания изменяется проницаемость клеточной мембраны и в определенной мере страдает активный транспорт аминокислот. Однако, в почечных срезах, обработанных вышеупомянутыми агентами после инкубации определяется почти столько аминокислот, сколько в срезах контрольных опытов. Это очевидно связано с одной стороны дополнительным пассивным транспортом аминокислот из инкубационной среды во внутрь клеток, а с другой— снижением активности ферментов, осуществляющих деаминирование вышеупомянутых аминокислот.

Ряд авторов показал, что при замораживании тканей имеет место значительные нарушения структуры клеточных мембран ([8, 9]). В этих условиях, как показывают наши исследования, деамидирование глютамина почти не страдает. Таким образом, опыты показывают, что при повреждении клеточной мембраны страдает именно окислительное деаминирование аминокислот. Очевидно нарушаются также другие метаболические звенья, связанные с окислительными процессами. Установлено, что при нарушении целостности клеточной мембраны (гомогенат) значительно подавляются окислительные процессы ([4, 5]).

Результаты исследований показывают, что процессы деаминирования L-аминокислот, которые протекают в митохондриях клеток, тесно связаны с функциональным состоянием наружной клеточной мембраны. По-видимому, наружные мембраны клеток по определенным каналам связаны с митохондриями и другими органеллами клеток.

Известно, что во внутриклеточном пространстве имеется широкая сеть эндоплазматического ретикулума, которая структурно и функционально связана с наружной клеточной мембраной. Имеются указания, что этим путем клеточная мембрана осуществляет свое регулирующее влияние на внутриклеточные процессы.

Ряд авторов показал, что определенные вещества, как например, инсулин, не проникая во внутрь клетки, связывается с ее наружной мембраной и оказывает значительное влияние на течение метаболических процессов, протекающих внутри клетки. Очевидно, под действием инсулина, а также под действием вышеупомянутых мебранноактивных агентов, применявшимися нами в опытах, происходят определенные

изменения в ультраструктуре клеточных мембран, что соответствующим образом отражается на определенные внутриклеточные обменные процессы.

Имея в виду стимулирующее действие кислорода на процессы деаминирования аминокислот в срезах почек (на гомогенат не оказывает влияния), можно полагать, что при этом повышается энергетический уровень клетки, что играет важную роль в поддержании нормальной структуры клеточных мембран и осуществлении их функциональной деятельности. Показано, что структурная организация клеточных мембран не находится в стабильном состоянии, а подвергается динамическим изменениям (конформационные изменения компонентов мембран) в зависимости от состава внеклеточной жидкости и интенсивности внутриклеточных метаболических процессов, в частности, от окислительных процессов, протекающих в митохондриях Образование сравнительно большого количества аммиака при преинкубации почечных срезов с вышеупомянутыми мембранно-активными соединениями в аэробных условиях (O_2+CO_2) связано с частичным восстановлением повреждений клеточных мембран. Показано, что в условиях высокого напряжения кислорода усиливаются окислительные процессы и повышается энергетическое состояние клеток.

Институт биохимии Академии наук
Армянской ССР

Ф. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Կ. Գ. ԲԱՋԱՆՅԱՆ

Բջջային թաղանթների կառուցվածքը և ամինաթթուներից ամիակի առաջացումն երիկամների կեղևային շերտում

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային շերտի կտրվածքների և հոմոգենատների վրա։

Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ բջիջների թաղանթների ամրողջականությունը կարևոր նշանակություն ունի բնական ամինաթթուներից (գլյուտամինաթթու, ասպարագինաթթու, օրնիտին) ամիակի առաջացման պրոցեսների վրա։ Այդ թաղանթների նուրբ կառուցվածքի խախտման դեպքում պրոտեոլիտիկ (տրիպսին), լիպոլիտիկ (ֆոսֆոլիպազա «C») ֆերմենտների կամ դետերգենտների (դեզօքսիխոլաթթու, տրիտոն X—100) ազդեցության տակ, ինչպես նաև երիկամային հյուսվածքի հոմոգենիզացման և սառեցման ժամանակ, նկատվում է ամինաթթուների դեամինացման պրոցեսների զգալի արգելակում։

Ենթադրվում է, որ բջջային թաղանթներն ակտիվ կերպով մասնակցում են ներբջջային գոյացություններում տեղի ունեցող նյութափոխանակության պրոցեսներին և կարգավորում նրանց ընթացքը։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *H. Davson, J. F. Danielli*, The permibility of natural membrans, 1952. [2] *J. D. Robertson* In: Cellular membrans in development, 1964 [3] *Л. Д. Бергельсон* Журн.

Всесоюзн. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, 20, (3), 322, (1975). [4] *Г. Х. Буняпян, А. С. Оганесян, Ж. С. Геворкян*, ДАН СССР, 177, (4), 951, (1967). [5] *Г. Х. Буняпян, А. С. Оганесян, Ж. С. Геворкян*, Биол. журн. Армении, 20, (4), 107, 1967. [6] *H. A. Krebs*, Biochem. J., 29, (7), 1620, (1935). [7] *А. Е. Браунштейн, Р. М. Азарх*, Биохимия, 9, (6), 337, (1944). [8] *H. N. Althal, V. K. Karla* a *A. F. Brodie*, Arch. Biochem. Biophis., 168, 122, (1975). [9] *K. Y. Walton, M. Kervina, S. Fleischer* a *D. S. Don*, Bioenergist. 1. 3, (1970). [10] *V. Sica, P Cuatricasas*, Biochemistry, 12, 2282, (1973). [11] *Л. К. Старосельцева*, „Пробл. эндокринол"., № 5, 108, 1974.