

УДК 577.352.5:577.112.3:599.323.4

Н.Н. АЙРАПЕТЯН

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ И БИОСИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ В ОРГАНАХ КРЫС

Допустив, что в гомогенатах печени крыс биосинтез мочевины протекает за счет аммиака аминокислот, дезаминирование которых происходит благодаря незамедлительному вовлечению освободившегося аммиака, мы исследовали влияние аминокислот на интенсивность биосинтеза мочевины в гомогенатах печени, почек, мозга крыс. В результате удалось выявить дезаминирование в гомогенатах 4 различных аминокислот и процесс вовлечения образовавшегося при этом аммиака в процесс биосинтеза мочевины. Процесс синтеза мочевины в гомогенатах изучался в условиях опытов, описанных Ratner а. Pappas, но с некоторыми изменениями.

Орнитиновый цикл мочевинообразования в печени уреотелических организмов является основным механизмом нейтрализации аммиака. Не вызывает сомнения факт, что основным источником аммиака в тканях являются аминокислоты. Еще в ранних исследованиях Кноопа и далее Кребса [1] было доказано, что срезы органов, главным образом, печени и почек при инкубации с природными и неприродными аминокислотами продуцируют аммиак и употребляют  $O_2$ , т.к. дезаминирование аминокислот происходит окислительным механизмом. Дальнейшие исследования установили, что в некоторых органах млекопитающих (печень, почки, мозг крыс), в печени лягушек и птиц, а также в высших грибах содержится оксидаза D-аминокислот, ФАД-зависимые ферменты, дезаминирующие около 12 D-аминокислот [2]. Обнаружена оксидаза L-аминокислот в печени, почках крыс, в дрожжах, у некоторых высших грибов, которая, однако, менее активна, чем предыдущие ферменты. Из почек крыс выделен высокоактивный препарат оксидазы L-аминокислот, ФАМ-зависимых, с оптимумом  $pH=10$  и низкими ферментативными оборотами [3]. Показано присутствие почти во всех органах и организмах глутаматдегидрогеназы, катализирующей окислительное дезаминирование глутамата. Этот НАД (ИНАДФ) – зависимый фермент, наиболее изученный, обладающий аллостерическими свойствами, в частности, аллостерически ингибируется восстановленным НАД,  $NH_3$ , АТФ, ГТФ, и, наоборот, аллостерически активируется АМФ. Константа равновесия глутаматдегидрогеназной реакции весьма низкая и в энергетическом отношении легче происходит аминирование  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты аммиаком в присутствии НАДН и еще лучше НАДФН [4-6]. В печени животных выявлены серин- и трионин-дегидратазы, а также цистин-десульфгидраза, катализирующие неокислительное дезаминирование указанных аминокислот. В литературе дискутируются также вопросы о существовании и других ферментов, дезаминирующих отдельные аминокислоты (орнитин, аспартат, аланин, триптофан и другие), но проявляющих весьма слабую активность [7,8]. Срезы коркового слоя почек крыс интенсивно дегаминируют некоторые аминокислоты, в частности глутамат, аспартат и особенно интенсивно орнитин.

Следует подчеркнуть, что ни в одном организме и тем более ни в одной ткани не присутствует полный набор ферментов, который обеспечивает дезаминирование всех природных аминокислот, потому и вопрос механизма аммиакообразования из аминокислот является проблематичным до сих пор. Убедительным кажется пред-

ложенный Браунштейном механизм трансдезаминирования всех аминокислот в системе присутствующих во всех клетках и тканях трансаминаз и глутаматдегидрогеназ [2,8-12]. Тем не менее трансдезаминирование берется под сомнение рядом исследователей в силу того, что в гомогенатах глутаматдегидрогеназа не катализирует дезаминирование глутаминовой кислоты из-за высокого содержания аммиака, и в этих условиях аминокислота глутамата переаминируется со ЩУК с образованием аспартата [13-18]. На самом деле, наблюдаемое дезаминирование глутамата других аминокислот в срезах печени и почек крыс не обнаруживается в гомогенатах тех же органов. Очевидно, сохранность целостности клеточных мембран, обеспечивающих активную экскрецию аммиака из клеток, является необходимым условием функционирования дезаминирующих ферментов аминокислот. Хотя это заключение является весьма логичным, оно нуждается в дополнительных экспериментальных доказательствах. Совершенно труднообъяснимым является тот факт, что при инкубировании гомогенатов без каких-либо добавок извне продуцируется аммиак, несмотря на то, что в этих условиях, как уже отмечалось, механизм трансдезаминирования не может функционировать. В этих условиях проследить прирост аммиака за счет убыли свободных аминокислот невозможно из-за непрекращающегося протеолиза белков и пополнения фонда свободных аминокислот. Можно допустить, что дезаминирование аминокислот в клетках осуществляется из-за непрерывного вовлечения в биосинтез глутамина и удаления аммиака (путем диффузии или в форме глутамина), что обеспечивает весьма низкий внутриклеточный уровень аммиака, не препятствующий функционированию глутаматдегидрогеназы и других указанных ферментов дезаминирования аминокислот. Если это так, то связывание аммиака любым способом будет способствовать дезаминированию аминокислот и в гомогенатах. Учитывая, что орнитинный цикл нейтрализует аммиак путем его первоначального вовлечения в биосинтез карбамилфосфата под влиянием карбамилфосфатсинтетазы митохондрий печени уреотелических организмов (далее, карбамилфосфат с остальными 4 ферментами орнитинового цикла последовательно превращается в цитруллин, аргиносуццинат, аргинин и мочевину), можно допустить, что в гомогенатах печени крыс биосинтез мочевины протекает за счет аминокислот, дезаминирование которых происходит благодаря незамедлительному вовлечению освобожденного аммиака. С целью проверки гипотезы нами исследовалось влияние аминокислот на интенсивность биосинтеза мочевины в гомогенатах мозга, печени, почек. Соответствующие данные приведены в таблице.

**Методика.** Процесс синтеза мочевины в гомогенатах изучали в условиях опытов, описанных Ratner a Pappas [19], но с небольшими видоизменениями: гомогенат, приготовленный на 0,05M К-фосфатном буфере pH=7,4, инкубировали в присутствии 20MкM L-орнитина, 25MкM - NH<sub>4</sub>Cl, 10MкM - АТФ, 5MкM - MgSO<sub>4</sub>, 20MкM - янтарной кислоты, аргиназы (sigma) - в 1мг (20 ед.). После 40 мин. инкубации реакцию останавливали кипячением и определяли мочевину. Для этого к прокипяченному пробам добавляли 2мг высокоактивного препарата уреазы (sigma), инкубировали 30 мин., после чего реакцию останавливали добавлением 15% ТХУ, через 15 мин. центрифугировали и в супернатанте определяли количество аммиака микродиффузионным методом Зеллингсона [20].

**Собственные исследования.** Данные таблицы показывают, что в контрольной пробе, инкубированной без аминокислот, содержится определенное количество мочевины в гомогенатах изученных органов крыс (6,3-7,4 MкM на 1г свежей ткани). При инкубировании пробы с L-орнитином в гомогенатах печени происходит значительный биосинтез мочевины: содержание мочевины почти удваивается (15,66 MкM), тогда как в гомогенатах почек и мозга стимулировать биосинтеза мочевины не происходит. Это объясняется отсутствием фермента биосинтеза цитруллина в почках и мозге.

В варианте полной пробы без NH<sub>4</sub>Cl, но с глутаминовой кислотой происходит незначительный прирост мочевины в гомогенатах печени (7,69 MкM). Проверочные опыты показали, что при этом в гомогенате печени происходит прирост глутамина

примерно на 4 Мкм (на 1г свежей ткани). Можем заключить, что в указанном варианте произошел прирост аммиака на 4 с лишним Мкм, который был израсходован в основном для амидирования глутамата, и лишь небольшая его часть вовлеклась в процесс биосинтеза мочевины. В аналогичных условиях в гомогенатах почек и мозга по указанным причинам не происходит прироста мочевины.

*Влияние аминокислот на интенсивность биосинтеза мочевины (мкмоль/г свежей ткани) в гомогенатах мозга, почек, печени (приведены средние данные из 7-8 опытов)*

Состав пробы	Печень	Почки	Мозг
полная проба, фиксированная до инкубации	5,38±0,24	4,08±0,22	4,58±0,22
полная проба, инкубированная без аминокислот	7,41± 0,23	6,30 ± 0,19	6,74 ± 0,24
полная проба с L-орнитинином	15,66± 0,58	6,33 ± 0,17	6,89 ± 0,20
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl	6,08±0,20	6,36 ± 0,16	6,68 ± 0,18
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl с глутаминовой кислотой	7,69±0,21	6,28 ± 0,22	6,12 ± 0,24
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl с аспаратом	11,04±0,36	6,40 ± 0,31	6,78 ± 0,31
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl с L-орнитинином	10,12±0,24	6,30 ± 0,36	6,49 ± 0,28
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl с аланином	8,89±0,18	6,14 ± 0,21	6,48 ± 0,18
полная проба без NH <sub>4</sub> Cl с α-глутамин. кис-ой, L-аспаратом, L-орнитинином, L-аланином	15,84±0,58	6,48 ± 0,38	6,90 ± 0,44
полная проба с L-цитруллином	17,42±0,64	11,36 ± 0,40	10,04 ± 0,46
полная проба с L-цитруллином и с L-аспаратом	21,40±0,58	12,21 ± 0,54	13,22 ± 0,58

В пробах без NH<sub>4</sub>Cl, но с L-аспаратом происходит значительный биосинтез мочевины (11,04 Мкм), уступающий, однако, интенсивности биосинтеза с L-орнитинином. Это свидетельствует о том, что L-аспарат заметно дезаминировался и образовавшийся аммиак вовлекался в биосинтез мочевины не так интенсивно из-за недостатка L-орнитина в среде. В пробах без NH<sub>4</sub>Cl, но с орнитинином происходит значительный биосинтез мочевины (10, 12 Мкм), но уступающий биосинтезу мочевины с аммиаком и орнитинином. В последнем случае, по-видимому, L-орнитин значительно дезаминировался, но имелся недостаток в аспарате.

В варианте без NH<sub>4</sub>Cl в присутствии аланина происходит незначительный биосинтез мочевины (8,89Мкм) в гомогенатах печени, что указывает на слабое дезаминирование аланина и на ограниченные возможности образования аспарата из аланина в гомогенатах.

В пробах без NH<sub>4</sub>Cl, но в присутствии глутамата, аспарата, орнитина и аланина происходит интенсивный биосинтез мочевины (15,14Мкм), доходящий до интенсивности процесса в варианте пробы в присутствии аммиака и L-орнитина. Очевидно, в указанных условиях происходит дезаминирование добавленных 4 аминокислот, что обеспечивает процесс биосинтеза мочевины аммиаком в достаточной степени.

В пробах с L-цитруллином и, особенно с цитруллином и L-аспаратом в гомогенатах печени биосинтез мочевины достиг своего максимума (17,42 и 21,40 Мкм соответственно). При этом в аналогичных условиях проявляется активность биосинтеза мочевины в гомогенатах почек и мозга.

Полученные данные позволяют заключить, что в гомогенате печени L-глутамат, L-аспарат, L-аланин, L-орнитин интенсивно дезаминируются благодаря тому, что образующийся при этом аммиак вовлекается в присутствующий в митохондриальной фракции карбомилфосфат. К сожалению, из-за отсутствия карбомилфосфатсинтетазы в почках и мозге, в гомогенатах в наших экспериментах указанными подходами не удастся раскрыть возможное дезаминирование.

По результатам наших экспериментов выявлены дезаминирование в гомогенатах печени 4 различных аминокислот и процесс вовлечения образовавшегося при этом аммиака в процесс биосинтеза мочевины.

Одновременно подтверждены данные о присутствии в почечной и мозговой тканях последних 3 ферментов орнитинового цикла, катализирующих биосинтез мочевины из цитруллина с вовлечением аминного азота аспартата.

Научно-исследовательская лаборатория  
сравнительно-эволюционной биохимии

Поступила 10.02.1998

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Krebs H.A. Metabolism of aminoacids III. Deamination of aminoacids.- Biochem J., 1935a, v.29, p.1620-1664.
2. Браунштейн А.Е. Биохимия аминокислотного обмена. М.: изд-во АМН СССР, 1949, с.426.
3. Krebs H.A. The metabolic fate aminoacids.- In Mammalian protein metabolism (Mumo H., Allison I eds) Acad. Press N. J., 1964, v.1, p. 125-176.
4. Olson J.A., Anfinsen C. B. Kinetic and equilibrium stuches on cristalline l-glutamic acid dehidrogenase.- J.Biol. Chem, 1953, v.202, p. 841-856.
5. Strecker H.J. Cristalisation of L-glutamic acid dehidrogenase from liver.- Arch. Biochem. Biophys., 1951, v. 32, p.448-450.
6. Stecker H.J. Clutamic dehidrogenase.- Arch.- Biochem., Biophys., 1953, v.46, p.128-140.
7. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Теория процессов аминокислотного обмена, катализируемых пиридоксальовыми энзимами., Докл. АН СССР, 1952, т.85, с. 115-118.
8. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Теория процессов амнинокислотного обмена, катализируемых пиридоксальовыми энзимами.- Биохимия, 1953, т.18, с.393-411.
9. Браунштейн А.Е. Ферментативная система переаминирования, ее биология, значение и механизм действия. XI. Образование аминокислот путем интрамолекулярного переноса аминогрупп.- Биохимия, 1939, т. 4, с.667-690.
10. Браунштейн А.Е., Азарх Р.М. Влияние подавления реакций переаминирования на синтез аминокислот в средах и гомогенатах печени.- Биохимия, 1957, т.22, с.430-438.
11. Браунштейн А.Е., Азарх Р.М. О механизме дезаминирования L-амнинокислот в тканях печени и почек. XX сообщение об образовании и распаде аминокислот путем интермолекулярного переноса амниногрупп.- Биохимия, 1944, т.9, с.337-357.
12. Крицман М.Г. Ферментативное переаминирование аспарагиновой кислоты. XII сообщение об образовании и распаде аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогрупп.- Биохимия, 1939, т.4, с.691-701.
13. Априкян Г.В., Шагинян В.А. Роль глутаматдегидрогеназы в окислительном дезаминировании глутаминовой кислоты в мозгу и печени на разных этапах постнатального развития.- В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ер.: АН Арм. ССР, 1973, т.8, с.91-105.
14. Balazs R. Control of glutamate oxidation in brain and liver mitochondrial sistems.- Biochem J., 1965, v.95, p.497-508.
15. De Haan E.J., Tager J.M., Slater E.C. Factors affecting the pathway of glutamate oxidation in rat-liver mitochondria.- Biochem, Biophys., Acta, 1967, v.131, p.1-13.
16. Schoolwenth A.C., Hoover W.J., Daniel C.H., La Nove K.F. Effect of aminoxyacetate and L-ketoglutarate on glutamate deamination by rat kidney mitochondria.- Ent J. Biochem., 1980, v. 12, p.145-149.
17. Katunuma N., Okada M. The formation of glutamate from carbonidrates or fatty acids through TCA cycl.- Proc. Japan. Acad., 1962, v.38, p.8-14.
18. Pappas., Tager J.M., Francavilla A., Haan C.J., Quagliariello E. Control of glutamate dehidrogenase activity during glutamate oxidation in inolated rat liver mitochondria.- Biochem., Biophys. Acta, 1967, v.131, p.14-28.
19. Ratner S., Pappas A. Biosynthesis of urea. N.Arginine synthesis from citrylline in liver ogenates.- J. Biol. chem., 1949b, v.179, p.1199.
20. Sellingson D., Sellingson H. A mikrodifussion method for the determination of Nitrogen liberated as ammonia.- J. Lab. Clin. Med., 1951, v.38, p.324.

#### Ն.Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԴԵՉԱՄԻՆԱՑՄԱՆ ԵՎ ՄԻՉԱՆՅՈՒԹԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ  
ԿԱՊԸ ԱՌՆԵՏԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ

#### Ա մ փ ո փ ո մ

Հաշվի առնելով, որ առնետի յարդի հոմոգենատում միզանյութի կենսասինթեզը կատարվում է ամինաթթուների  $\text{NH}_3$ -ի անմիջական ընդգրկմամբ՝ մենք ուսումնասիրել ենք ամինաթթուների ազդեցությունը միզանյութի կենսասինթեզի ինտենսիվության վրա առնետի յարդի, երկամների և ուղեղի հոմոգենատներում:

Հոմոգենատներում հայտնաբերվել են 4 ամինաթթուների դեզամինացումը և այդ ընթացքում առաջացած  $\text{NH}_3$ -ի ընդգրկումը միզանյութի կենսասինթեզի մեջ: Հոմոգենատներում միզանյութի կենսասինթեզի պրոցեսը ուսումնասիրվել է Ratner a Pappas-ի կողմից նկարագրված պայմաններում՝ որոշ փոփոխություններով: