

А. Ф. ЛАЗАРЕВ

ОБРАЗОВАНИЕ ГИДАНТОИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЕРЕЖИВАЮЩИХ ТКАНЯХ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 12 VI 1948)

Схема образования мочевины — так называемый „орнитиновый цикл“ — была предложена еще 16 лет тому назад⁽¹⁾, но мы ничего не знали о происхождении уреидной группы, играющей столь большую роль как в образовании мочевины, так и в образовании креатина в животном организме.

Была сделана лишь одна попытка фактически обосновать высказанное еще ранее предположение⁽¹⁾ об образовании уреидной группы из аммиака и углекислоты на стенке орнитина⁽²⁾. Однако эту попытку, как по мнению других авторов⁽³⁾, так и по нашим данным, нельзя признать удачной, так как в ее основе лежала неудовлетворительная аналитическая методика.

Поскольку основной трудностью в исследовании механизма образования уреидной группы является отсутствие надежной и специфической методики анализа уреидов, мы прежде всего занялись разработкой такой методики, которая позволила бы отдельно определять уреиды в их смеси. В процессе этой работы мы получили данные, которые привели нас к доказательству присутствия и образования в животных тканях первичного носителя уреидной группы — гидантоиновой кислоты, являющейся по своей химической структуре ближайшим из известных гомологов цитруллина. Вопреки мнению других авторов^(1,2), образование первичной уреидной группы происходит не на орнитине, а на глицине. Если к переживающим срезам белых крыс в бикарбонатном буфере добавить глицин и аммиак, то можно наблюдать образование гидантоиновой кислоты, резко увеличивающееся при добавлении глутамина. Изложению соответствующих данных и посвящено настоящее сообщение.

Техника. Приготовленные обычным способом срезы печени белых крыс погружались в колбочки, предварительно наполненные бикарбонатным раствором Рингера и, по мере необходимости, соответствующими растворами исследуемых веществ. Колбы закрывались насадками с двумя отверстиями для пропуска газовой смеси (O_2 — 95%, CO_2 — 5%), закреплялись в водяном термостате с качалкой и соединялись между собой резиновыми трубками для пропуска газа. По окончании опыта колбы вскрывались, срезы удалялись, промывались в дистиллированной воде, сушились и взвешивались. Содержимое колб доводилось слабой соляной кислотой до $pH=6,0$ и переливалось в мерные пробирки на 10 мл. Колбы промывались 2 мл фосфата и промывки присоединялись к основному раствору. Депротенизация производилась при $pH=6,0$ кипячением на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения и доведения водой до метки содержимое колб взмучивалось и фильтровалось.

3 мл фильтрата пропускались через колонку, наполненную 0,85 г пермутита; высота колонки 7 см, внутренний диаметр 5 мм. При этом цитруллин адсорбировался, а гидантоиновая кислота свободно проходила в приемник. Следы гидантоиновой кислоты, задержанные колонкой, отмывались 3 мл 0,3% раствора NaCl, содержимое приемника доводилось водой до 6,0 мл, добавлялось 0,6 мл раствора уреазы, приготовленной по Самнеру (4), и выдерживалось 30 мин. при 30°С для разложения мочевины. После этого 3 мл раствора, свободного от мочевины, отмеривались пипеткой в пробирки, куда медленно, при охлаждении водой, добавлялся затем 1 мл 3% раствора диацетилдиоксида в серной кислоте. Пробирки помещались в кипящую водяную баню на 30 мин. После охлаждения пробирок интенсивность образующейся при нагревании окраски сравнивалась в фотометре Пульфриха при светофильтре № 7 со стандартными растворами гидантоиновой кислоты, обработанными подобным же способом. Компенсатором служили соответствующие количества уреазы и реактива, прогретые таким же образом, как и исследуемые растворы.

Для анализа цитруллина адсорбированный пермутитом цитруллин элюировался фосфатом при pH=7 и обрабатывался затем диацетилдиоксидом в тех же условиях, что и растворы гидантоиновой кислоты, свободные от мочевины. Окраска как исследуемых растворов, так и стандартных в обоих случаях остается стабильной на протяжении нескольких часов.

Результаты и их обсуждение. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, срезы печени белых крыс, немедленно фиксированные и депротеинизированные, содержат 20—21 мг гидантоиновой кислоты на 100 г свежей ткани, в то время как цитруллин полностью отсутствует как в срезах, так и в опытном растворе. В процессе инкубации срезов в растворе Рингера без каких-либо добавок, за исключением углекислоты, образуется дополнительное количество гидантоиновой кислоты из предобразованных или уже имеющихся в срезах веществ.

Таблица 1

Накопление гидантоиновой кислоты в растворе Рингера под влиянием срезов печени

(Рингер бикарбонат 5 мл, pH = 7,4, t = 37°С)

Сухой вес срезов в мг	Продолж. опыта в час.	Найдено гидантоиновой кислоты		Средний прирост гидантоиновой кислоты в час на 100 г ткани в мг	Найдено цитруллина
		в исслед. растворе в мг%	на 100 г ткани в мг		
21,0	0	0,1	21	—	} Не обнаружено
22,5	0,5	0,2	39	36	
23,5	1,0	0,3	56	35	
28,0	2,0	0,45	71	15	
21,5	3 0	0,4	83	12	
22,0	4 0	0,45	90	7	

Данные четвертой колонки получены путем умножения на расчетный фактор, равный: $\frac{10}{5} \times 2 \times 1,1 \times \frac{5}{100} \times \frac{100\,000}{5w} = \frac{4400}{w}$, где w — сухой вес срезов в мг. В основу расчетного фактора положено следующее: исходный раствор Рингера, равный 5 мл, разбавлялся при депротеинизации до 10 мл и затем при разделении гидантоиновой кислоты и цитруллина еще в 2 раза; 1,1 — это коэффициент разбавления при обработке раствора уреазой; сухой вес срезов приравнен 5-кратному сухому весу.

Данные табл. 2 показывают, что прибавление к срезам только глицина, или аммиака, или глутамин не влияет на образование гидантоиновой кислоты. в то время как совместная добавка аммиака и глицина увеличивает образование гидантоиновой кислоты на 35—45%. Это увеличение возрастает в 6 раз, если к глицину и аммиаку добавить еще глутамин. Совместная добавка глутамин и аммиака увеличивает прирост гидантоиновой кислоты лишь в 1,5 раза.

Таблица 2

Сравнительное влияние глицина, аммиака и глутамин на ускорение процесса образования гидантоиновой кислоты в срезах печени

(Рингер бикарбонат 5 мл, рН = 7,4, $t = 37^{\circ} \text{C}$, продолжительность 3 часа)

№№ опытов	Сухой вес срезов в мг	Добавлено в мол.			Найдено гидантоиновой кислоты на 100 г ткани в мг
		глицина	аммиака	глутамин	
1	19,0	—	—	—	58
2	23,5	0,04	—	—	56
3	25,0	—	0,02	—	59
4	25,5	—	—	0,01	60
5	20,0	0,04	—	0,01	66
6	21,5	0,04	0,02	—	82
7	22,5	—	0,02	0,01	98
8	18,0	0,04	0,02	0,01	196
9	23,0	0,04	0,02	0,01	174

Этот факт находит подтверждение и объяснение в табл. 3, в которой сведены данные о влиянии на образование гидантоиновой кислоты различных концентраций глицина при постоянных концентрациях глутамин и аммиака. Эти данные указывают на мало существенное значение добавок глицина. Приходится принять, что в срезах глицин легко мобилизуется на нужды синтеза гидантоиновой кислоты, или сам глутамин служит неким источником глицина.

Данные табл. 4 указывают на каталитическую роль глутамин в синтезе гидантоиновой кислоты. Однако сам глутамин не является источником готовой уреидной группы (см. табл. 2, опыты №№ 4 и 5). Механизм действия глутамин нам еще не ясен.

Приведенные данные указывают на то, что в срезах печени белых крыс присутствует и образуется гидантоиновая кислота. Это образование происходит за счет других веществ, за исключением цитруллин и аммиака, которые в условиях нашего метода вели бы себя подобным же образом. Возможное присутствие аллантаина не мешает определению гидантоиновой кислоты и цитрулина по нашему методу. Для контроля этих фактов мы депротеинизировали тканевые экстракты и затем добавляли соответствующие компоненты синтеза. или добавляли глутамин к депротеинизированным тканевым растворам, содержащим уже другие компоненты, и в обоих случаях не наблюдали разницы с контролем. Эта проверка указывает на то, что в нашем случае образование гидантоиновой кислоты является биологическим синтезом. Мы отдаем себе отчет, что исчерпывающее доказательство приведенных данных придет вместе с выделением и идентификацией продукта исследуемого нами синтеза.

Об интимной стороне механизма образования гидантоиновой кислоты пока можно лишь догадываться. Известно, что при пропускании углекислоты в щелочной раствор глицина был выделен глицинкарбо-

Таблица 3

Влияние различных концентраций глицина на синтез гидантоиновой кислоты в срезах печени в присутствии глутамина, аммиака и углекислоты

(Рингер бикарбонат 5 мл, рН = 8, $t = 37^{\circ}\text{C}$, продолжительность 3 часа, глицин 0,01 мол., NH_4Cl 0,02 мол.)

Добавлено глицина мол/л	Найдено гидантоиновой кислоты на 100 г ткани в мг
0,04	160
0,02	164
0,01	150
0,005	137
0,0015	128
0,00152	114
0,000625	100
0	108

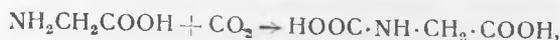
Таблица 4

Влияние глутамина на ускорение синтеза гидантоиновой кислоты из глицина, углекислоты и аммиака в срезах печени

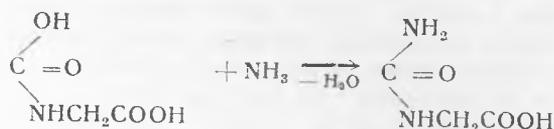
(Рингер бикарбонат 5 мл рН = 8, $t = 37^{\circ}\text{C}$, продолжительность 3 часа, глицин 0,02 мол., NH_4Cl 0,02 мол.)

Добавлено глутамина мол/л	Найдено гидантоиновой кислоты на 100 г ткани в мг
0,02	265
0,01	196
0,005	184
0,0025	135
0,00125	123
0,000625	99
0	83
0	79

новокислый кальций⁽⁵⁾. Этот факт дает нам некоторое основание предполагать, что образование гидантоиновой кислоты происходит в две фазы: вначале из глицина и углекислоты образуется карбаминоглицин



который затем с аммиаком образует уже гидантоиновую кислоту



Но это лишь схема реакции. Значение глутамина для этой реакции указывает на более сложный ее механизм.

Образование первичного носителя уреидной группы — гидантоиновой кислоты — не решает вопроса о дальнейшей судьбе этой группы. Однако мы не смогли наблюдать образование цитруллина в отсутствие гидантоиновой кислоты. Этот факт говорит за то, что наши данные, возможно, имеют более общее значение и не исключено, что сама гидантоиновая кислота может служить своеобразным депо готовых уреидных групп для синтеза других уреидов типа цитруллина.

Приношу сердечную благодарность акад. Я. О. Парнасу за внимание к этой работе.

Лаборатория физиологической химии
Академии Наук СССР

Поступило
19 V 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. A. Krebs и K. Henseleit, Z. physiol. Chem., **210**, 33 (1932).
² A. G. Gornall and A. Hunter, J. Biol. Chem., **147**, 593 (1943). ³ S. J. Bach, E. M. Groot and S. Williamson, Biochem. J., **38**, 325 (1944). ⁴ J. B. Sumner, J. Biol. Chem., **69**, 435 (1926). ⁵ M. Siegfried, Z. physiol. Chem., **44**, 85 (1905).