

М. Г. КРИЦМАН и К. В. ДРУЖИНИНА

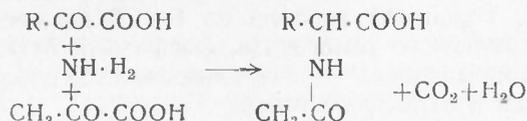
**МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ В ПЕЧЕНИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 12 X 1949)

Механизм биологического синтеза аминокислот путем утилизации аммиака мало изучен; до самого последнего времени оставался невыясненным вопрос об источнике водорода для гидрирующего аминирования.

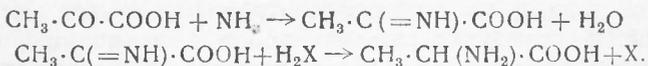
Для объяснения механизма синтеза аминокислот в животном организме прибегали к представлениям об ацетилирующем или гидрирующем аминировании, руководствуясь аналогией с модельными ферментативными реакциями синтеза аминокислот.

Согласно теории ацетилирующего аминирования, синтез аминокислот из аммиака и кетокислот происходит путем восстановительного аминирования молекулы кетокислоты, причем источником водорода в этом процессе служит пировиноградная кислота:

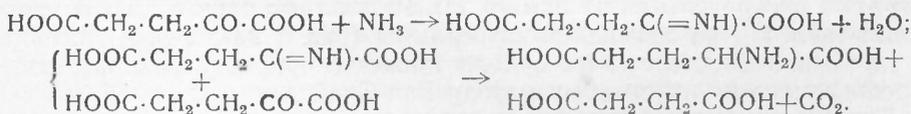


После работ Блоха и Риттенберга (1), показавших, что пировиноградная кислота не имеет преимущественного значения по сравнению с уксусной кислотой, при биологическом ацетилировании, а также исследованием Блоха и Борека (2), доказавших прямое ацетилирование аминокислот, нет достаточных оснований для признания ацетилирования пировиноградной кислотой первичной фазой гидрирования аминокислот.

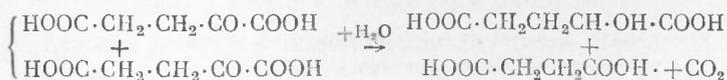
Схема восстановительного аминирования, предложенная Кнопом, также оставляет невыясненным вопрос об источнике водорода.



Для выяснения синтеза глутаминовой кислоты Кребсом (3) была предложена схема, по которой спонтанно образовавшаяся иминоглутаровая кислота восстанавливается в глутаминовую путем дисмутации с кетоглутаровой кислотой:



Однако в условиях опытов, описанных Кребсом, наряду с дисмутацией между иминоглутаровой и кетоглутаровой кислотами, происходит и дисмутация между двумя молекулами кетоглутаровой кислоты, приводящая к образованию оксиглутаровой кислоты по уравнению:



Нам представлялось вероятным, что образующиеся в этих условиях оксикислоты могут служить источником водорода при восстановительном аминировании кетокислот, а также и непосредственными субстратами аминирования. Для выяснения этого вопроса мы предприняли исследование синтеза аминокислот из аммиака и оксикислот.

В настоящем сообщении приводятся данные, показывающие, что в анаэробных условиях опыта происходит синтез аланина из аммиака и молочной кислоты, а также образование глутаминовой кислоты из аммиака и оксиглутаровой кислоты\*.

### Экспериментальная часть

Опыты проводились с отмытыми изотоническими гомогенатами печени крысы.

Навеска печени, погруженная в охлажденный изотонический раствор KCl (0,85%), сперва измельчалась ножницами, а затем тщательно растиралась в стеклянном гомогенизаторе на холоду. К полученной массе добавлялся холодный изотонический раствор KCl, так чтобы на 1 г взятой ткани его приходилось 9 мл. Суспензия фильтровалась через два слоя марли для отделения кусочков неизмельченной ткани, если они сохранились при гомогенизации.

Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин. при 1700 об/мин. Центрифугат сливался и отбрасывался, к осадку добавляли 1/2 объема свежей порции раствора KCl. Осадок тщательно размешивался и суспензия вновь центрифугировалась в течение 10 мин. Центрифугат отбрасывался и промывание гомогената повторялось еще два раза.

Опыты проводились следующим образом: в газовые колбочки конструкции Г. П. Тороповой вносили по 1—1,5 мл свежеприготовленного 20—40% изотонического гомогената, фосфатный буфер M/8 pH 7,6, а в боковой отросток колбочки — нейтрализованные субстраты. Исследование проводилось в атмосфере азота.

Анаэробноз достигался двухкратным откачиванием воздуха из колбочки с последующим заполнением пространства азотом, предварительно очищенным пропусканием над раскаленными восстановленными медными стружками. Чтобы исключить присутствие в реакционной смеси каталитических количеств кетокислот, часть опытов по синтезу аминокислот из аммиака и молочной кислоты проводилась в присутствии карбонилсвязывающих реактивов: арсенита цианида, гидроксилamina. Параллельно опытам по синтезу из оксикислот ставились опыты по синтезу из кетокислот для сравнения их интенсивности. Контролем служили пробы, состоящие из гомогената, буфера и одного из субстратов. В части опытов контролем служила проба с кипяченым гомогенатом. Пробы инкубировались в водяном термостате при температуре 37—38° в продолжение 1—2 час.

Для определения аланина нами был применен специфический и чувствительный микрометод Александера (4). Кроме того, для идентификации синтезированных аминокислот нами был использован метод хроматографии распределения на бумаге (5). Результаты наших опытов приведены в табл. 1 и на снимке хроматограммы (рис. 1 на вклейке). О синтезе глутаминовой кислоты мы судили также по приросту аминного азота, определяемого по нитритному методу Ван-Слайка.

Прежде чем приступить к выяснению роли оксикислот в синтезе аминокислот, были поставлены опыты по синтезу аминокислот из аммиака и кетокислот в гомогенатах печени. Результаты этих опытов показали, что в отмытых изотонических гомогенатах происходит синтез глутаминовой кислоты и аланина из соответствующих кетокислот и аммиака. Резуль-

\* Оксиглутаровая кислота была синтезирована в нашей лаборатории Е. Е. Хаскиной, за что приносим ей благодарность.

таты последующих исследований показали, что с такой же интенсивностью происходит синтез и из оксикислот.

Таблица 1

Синтез аминокислот из оксикислот и аммиака в гомогенатах печени

1,5 мл отмытого гомогената печени крысы, 0,25 мл нейтрализованной оксикислоты, конечная концентрация 0,02 М, 0,25 мл  $\text{NH}_4\text{Cl}$  конечной концентрации 0,04 М, 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,6. Объем пробы 3 мл. Атмосфера  $\text{N}_2$

№ п/п.	Состав проб	Прирост аминокислот в $\mu$ -молях на 1 г сух. в.	
		аланин	глутаминовая кислота
1	Гомогенат + молочная кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	87	—
2	То же . . . . .	59	—
3	» » . . . . .	75	—
4	Гомогенат + пировиноградная кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	84	—
5	То же . . . . .	70	—
6	Гомогенат + оксиглутаровая кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	—	185,0
7	То же . . . . .	—	188,0
8	Гомогенат + кетоглутаровая кислота + $\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	—	133,0
9	То же . . . . .	—	178,0
10	» » . . . . .	—	66,0

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, в гомогенатах печени из молочной кислоты в анаэробных условиях опыта происходит синтез аланина, составляющий в среднем 75  $\mu$ молей на 1 г печени. В этих же условиях из пировиноградной кислоты и аммиака аланина синтезировалось 65—70  $\mu$ молей. Таким образом, по интенсивности процесс синтеза аланина из молочной кислоты не уступает таковому из пировиноградной кислоты.

Аналогичная закономерность установлена нами при сопоставлении синтеза из окси- и кетоглутаровой кислот. Синтез отдельных аминокислот из оксикислот и из соответствующих кетокислот идентифицирован нами и хроматографическим методом. Как видно из снимка хроматограммы, контрольные пробы, содержавшие хлористый аммоний или кетокислоту (проба 1, 2), при проявлении нингидрином не дали никаких пятен. Опытные пробы 3, 4, к которым были добавлены хлористый аммоний и пировиноградная кислота или хлористый аммоний и кетоглутаровая кислота, дали пятна, положение которых соответствует пятнам аланина и глутаминовой кислоты стандартной смеси аминокислот.

Совершенно аналогичные по положению пятна были обнаружены в опытах с молочной и оксиглутаровой кислотами в присутствии аммиака (пробы 5, 7). В пробе 5, состоявшей из гомогената, молочной кислоты и аммиака, равно как в аналогичной пробе 6, к которой был добавлен арсенит как фиксатор карбонильной группы, нами обнаружен аланин.

На этой же хроматограмме проявлена проба, состоящая из гомогената, оксиглутаровой кислоты и аммиака, в которой нами было обнаружено пятно, соответствующее глутаминовой кислоте. Эти данные подтверждают, что в отмытых гомогенатах печени крысы происходит использование оксикислот как непосредственных субстратов аминирования.

#### Обсуждение результатов

Произведенные нами исследования показали, что в гомогенатах печени в анаэробных условиях происходит синтез аминокислот из оксикислот

и аммиака, что свидетельствует о наличии в этой ткани энзиматической системы, катализирующей аминирование оксикислот. Сравнивая величины синтеза аланина из молочной кислоты и аммиака с количеством аланина, образовавшегося в опытах с пировиноградной кислотой (в аэробных и анаэробных условиях) в присутствии аммиака, можно прийти к заключению, что обнаруженный нами в печени процесс синтеза аминокислот из оксикислот по интенсивности не уступает синтезу при добавлении кетоакислот.

Недавно Висс<sup>(6)</sup> сообщил, что им обнаружен активный аэробный процесс синтеза аланина в гомогенатах печени из пировиноградной кислоты. Таким образом, в настоящее время имеются указания на аэробный<sup>(6,7)</sup> и анаэробный путь<sup>(7)</sup> синтеза аланина в гомогенатах печени из пировиноградной кислоты. Наши данные указывают также на наличие анаэробного процесса синтеза аланина из молочной кислоты. Согласно нашим прежним исследованиям<sup>(8, 9)</sup>, в переживающих срезах печени из пировиноградной кислоты и аммиака происходит синтез аланина непрямым путем, в результате удлинения углеродной цепи пировиноградной кислоты, превращения кетоакислот по циклу трикарбонных кислот, прямого аминирования дикарбонных кислот и последующего переаминирования аминокислот с пировиноградной кислотой.

Перечисленные данные дают основание сделать заключение, что в организме имеется несколько путей образования одних и тех же аминокислот. Представляется вероятным, что при нормальных условиях существования организма при наличии всех перечисленных ферментных систем преимущественный путь их образования определяется интенсивностью параллельно идущих и сопряженных процессов, в частности процессов превращения окси- и кетоакислот. На альтерированных системах в зависимости от условий опытов можно констатировать преимущественное протекание той или иной реакции.

В условиях опытов с переживающими тканями, где сохранены энзиматические системы фиксации углекислоты, превращения кетоакислот, активное протекание процесса переаминирования и др., интенсивно протекает синтез аланина непрямым путем. В гомогенизированной ткани, повидимому, создаются преимущественно условия для прямого аминирования окси- и кетоакислот. Возможность существования синтеза аминокислот из оксикислот дает ответ на вопрос об источнике водорода при образовании аминокислот путем восстановительного аминирования. По-видимому, синтез аминокислот и дисмутация кетоакислот являются сопряженными реакциями. Наличием процесса дисмутации кетоакислот обеспечивается образование оксикислот из кетоакислот, которые могут служить как непосредственными субстратами аминирования, так и источником водорода. По соображениям энергетическим синтез аминокислот из оксикислот нам представляется более вероятным, чем из кетоакислот, в связи с тем, что первый может протекать и при отсутствии свободной энергии в системе, в то время как второй требует наличия свободной энергии и источника водорода.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
12 VIII 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> K. Bloch and D. Rittenberg, *Journ. Biol. Chem.*, **159**, 45 (1945).  
<sup>2</sup> K. Bloch and E. Borek, *Journ. Biol. Chem.*, **164**, 483 (1946). <sup>3</sup> H. A. Krebs and P. P. Cohen, *Biochem. Journ.*, **33**, 1896 (1939). <sup>4</sup> B. Alexander and A. Seligman, *Biochem. Journ.*, **159**, 9 (1945). <sup>5</sup> R. Condsen, A. H. Gordon and A. J. P. Martin, *Biochem. Journ.*, **38**, 224 (1944). <sup>6</sup> O. Wiess, *Helv. Chem. Acta*, **31**, 1189 (1948). <sup>7</sup> М. Г. Крицман, VII Всесоюз. съезд физиологов, биохимиков и фармакологов, Медгиз, 1947, стр. 468. <sup>8</sup> М. Г. Крицман, *Биохимия*, **9**, 379 (1944). <sup>9</sup> М. Г. Крицман и С. С. Мелик-Саркисян, *Биохимия*, **10**, 1 (1945).