

М. Г. КРИЦМАН, А. С. КОНИКОВА и С. Я. ДАВЫДОВА

ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В КРОВИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 IX 1949)

Вопрос о наличии в крови процессов энзиматического синтеза аминокислот и белков является весьма существенным для характеристики роли крови в азотистом обмене животного организма. Однако, до настоящего времени, имеющиеся экспериментальные исследования не давали достаточных оснований для однозначного вывода по этому вопросу. В работе (1) было показано, что в изолированной цельной крови, к которой был добавлен бикарбонат натрия, меченный тяжелым углеродом C^{13} в присутствии аммиака, пировиноградной, фумаровой и кетоглутаровой кислот, происходит включение углерода в аминодикарбоновые кислоты, свободные и включенные в белки крови.

Этот факт мог быть объяснен только наличием в крови ферментных систем, катализирующих удлинение углеродной цепи пировиноградной кислоты путем конденсации углекислоты с пировиноградной кислотой, образования щавелевоуксусной кислоты, превращения кетокислот по циклу трикарбоновых кислот и последующего их аминирования или переаминирования.

Нами были проведены исследования процессов образования аминокислот в изолированной крови, содержащей ядерные и безъядерные эритроциты.

В настоящем сообщении приводятся данные, свидетельствующие о наличии в крови человека, крысы и голубя процессов переаминирования и синтеза аминокислот от кетокислот и свободного аммиака.

Экспериментальная часть

Исследования проводились с цельной гепаринизированной кровью человека, крысы и голубя; часть опытов была проведена с плазмой и отмытыми эритроцитами.

В газовые колбочки емкостью 100—150 мл вносили 2,5—5 мл свежей гепаринизированной крови, соответственно плазмы или отмытых эритроцитов, к ним добавляли 2,5 мл бикарбонатного буфера рН 7,3 и нейтрализованные кето-, окси- или аминокислоты конечной концентрации 0,25 М. В опытах по изучению синтеза аминокислот путем утилизации неорганического азота добавляли хлористого аммония конечной концентрации 0,01 М. Контролем служили пробы, к которым был добавлен в качестве субстрата один аммоний. В части опытов контролем служила проба, содержащая оба субстрата и кипяченую кровь.

Общий объем пробы 10 мл, зрелая инкубации 8—24 часа. Инкубация проб производилась в водяном термостате с качанием при 37°, в случае длительного опыта пробы содержались в водяной бане 4 часа, затем переносились в обычный термостат. Опыты проводились в атмосфере кислорода.

По окончании опыта пробы осаждались 8—10-кратным объемом спирта при слабом подкислении уксусной кислотой, коагулированные белки отфильтровывались, спиртовой фильтрат упаривался в вакууме до небольшого объема — обычно до 0,5 мл. Образовавшиеся аминокислоты идентифицировались методом хроматографии распределения на бумаге (2).

Полученные нами данные приведены на снимках хроматограмм (рис. 1—3 на вклейке). При изучении процесса синтеза аминокислот путем утилизации неорганического азота в крови человека были исследованы в качестве субстратов аминирования следующие кислоты: пировиноградная, фенилпировиноградная, фумаровая, яблочная, кетоглутаровая, кетоадипиновая и лимонная. Результаты наших опытов показали, что в цельной крови человека происходит синтез аминокислот из большинства перечисленных субстратов. На снимке хроматограммы рис. 1 приведены контрольные пробы 1, 2, 3, 4, опытные пробы 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и стандартная смесь аминокислот 12.

Как видно из снимка, в контрольных пробах аминокислоты не были обнаружены. В опытной пробе 5, в которой были добавлены аммиак и пировиноградная кислота, синтезировалась глутаминовая кислота, которая проявилась на хроматограмме соответствующим пятном, совпадающим с пятном глутаминовой кислоты стандартной смеси аминокислот. В пробе 6, содержащей фенилпировиноградную кислоту и аммиак, образование аминокислот не обнаружено. Судя по положению пятен в пробе 7, из фумаровой кислоты синтезируется аспарагиновая кислота, а в аналогичных условиях опыта из яблочной кислоты 8 синтезируются аспарагиновая и глутаминовая кислоты. В пробе 9 в присутствии кетоглутаровой кислоты происходило образование глутаминовой кислоты; в пробе 10 из кетоадипиновой синтезировалась аминокетадипиновая, в 11 из лимонной — глутаминовая кислота. Таким образом, из всех испытанных кислот только фенилпировиноградная кислота не подвергалась аминированию. Вероятно, в крови не представлена энзиматическая система синтеза фенилаланина из соответствующей кетокислоты.

Образование глутаминовой кислоты из пировиноградной кислоты в этих опытах, по видимому, произошло в результате удлинения углеродной цепи пировиноградной кислоты, последующего превращения ее по циклу трикарбоновых кислот и аминирования, как это показано в печени (3) и у бактерий (4).

При исследовании процесса синтеза аминокислот в крови крысы были использованы те же кислоты, что в опытах с кровью человека, и получены аналогичные результаты.

Так же как в крови человека, у крысы синтезируются только аминокетокислоты. Для выяснения вопроса о том, является ли процесс синтеза аминокислот особенностью крови, содержащей безъядерные эритроциты, или это более общая закономерность, присущая крови вообще, мы исследовали синтез аминокислот из вышеупомянутых кислот в крови птиц, в частности, голубя, содержащей ядерные эритроциты.

Полученные результаты показали, что в крови голубя синтезировались аспарагиновая, глутаминовая и аминокетадипиновая кислоты из соответствующих кислот. Очевидно, у всех трех биологических объектов представлены в основном одинаковые ферментные системы синтеза аминокислот. При рассмотрении этих данных обращало на себя внимание, что в крови голубя имеется большое количество предобразованного свободного глицина при практическом отсутствии его в крови человека и крысы. Этот факт не лишен известного биологического значения, если учесть, что в крови, содержащей ядерные эритроциты, происходит синтез гемина из глицина, в отличие от крови, содержащей безъядерные эритроциты, в которой данный процесс не обнаружен (5).

Отсутствие образования глутаминовой кислоты в пробе с кровью го-

лубя, в которой была добавлена пировиноградная кислота, в отличие от опытов с кровью человека и крысы обусловлено, повидимому, малой интенсивностью процесса превращения пировиноградной кислоты в дикарбоновую кислоту и аминирования последней в аминокислоту.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что в крови, содержащей ядерные и безъядерные эритроциты, представлены ферментные системы, катализирующие синтез структурных единиц белковой молекулы путем утилизации свободного аммиака.

Представлялось вероятным, что этот путь образования аминокислот в крови не является единственным и что подобно другим животным тканям образование аминокислот в крови может происходить также в результате процесса переаминирования.

Полученные одним из нас (6) отрицательные данные по переаминированию между глутаминовой и пировиноградной кислотами в гемолизатах крови не давали основания исключить наличие процесса переаминирования в цельной крови. При изучении этого процесса нами исследовались в изолированной цельной крови следующие реакции переаминирования: 1. глутаминовая + пировиноградная кислота; 2. аланин + кетоглутаровая кислота; 3. аспарагиновая + кетоглутаровая кислота; 4. аспарагиновая + пировиноградная кислота.

В зависимости от исследуемой реакции добавлялись соответствующие субстраты, в остальном постановка опыта была аналогична предыдущим.

На снимке хроматограммы рис. 2 приведены результаты исследования реакций переаминирования в крови человека, крысы и голубя. Пробы 1, 6, 11 — контрольные, 2, 7, 12 — опытные, с добавлением глутаминовой и пировиноградной кислот, 3, 8, 13 — опытные, с добавлением аланина и кетоглутаровой кислоты, 4, 9, 14 — опытные с аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами, 5, 10, 15 — опытные, содержавшие аспарагиновую и пировиноградную кислоты, 16 — стандартная смесь аминокислот. Данные проб 2, 7, 12 показывают, что процесс переаминирования между глутаминовой и пировиноградной кислотами мало интенсивен; с большей интенсивностью происходит переаминирование между аланином и кетоглутаровой кислотой — 3, 8, 13, а наиболее активно — между аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами — 4, 9, 14.

Переаминирование между аспарагиновой и пировиноградной кислотами — 5, 10, 15 практически отсутствовало. Для выяснения вопроса, с какой составной частью крови связаны обнаруженные нами процессы образования аминокислот, мы исследовали этот процесс в плазме и в отмытых эритроцитах. Полученные результаты приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, переаминирование аминокислот происходит как в плазме, так и в отмытых эритроцитах. Наличие процесса образования аминокислот в плазме представляет особый интерес, так как оно указывает на существование в организме внеклеточного синтеза аминокислот.

Обсуждение результатов

Установленная нами способность цельной крови синтезировать из различных кето- и оксикислот в присутствии аммиака аминокислоты обусловлено наличием в крови ферментных систем, катализирующих удлинение углеродной цепи, превращение кетокислот по циклу трикарбоновых кислот и присоединение аммиака.

Синтез аминокислот в крови отличается от такового других тканей животного организма отсутствием способности образовать монокарбоновые аминокислоты.

Согласно данным наших исследований, участие крови в образовании структурных единиц белка не ограничивается только синтезом аминокислот путем использования свободного аммиака: нами установлено

также активное образование в крови аминокислот путем переаминирования. Этот процесс имеет место в плазме и эритроцитах. Наличие переаминирования в плазме представляет существенный интерес, так как это указывает на возможность образования аминокислот в некоторых тканях животного организма без участия клеточных структур.

Характерно для превращения аминокислот в крови то, что направление процессов синтеза аминокислот как из свободного аммиака, так и путем переаминирования приводит к образованию аминокислотных кислот при практическом отсутствии способности образования монокарбоновых аминокислот. Наши данные дают основание считать, что кровь является не только транспортером азотсодержащих соединений (7), но и принимает активное участие в образовании и перестройке структурных единиц белковой молекулы.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
12 VIII 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Конилова, М. Г. Крицман, В. Н. Орехович и С. Я. Давыдова, ДАН, 66, 899 (1949). ² R. Conden, A. H. Gordon and A. Martin, *Biochem. Journ.*, 38, 224 (1944). ³ М. Г. Крицман, *Биохимия*, 9, 279 (1944). ⁴ А. С. Конилова, М. Г. Крицман, Л. М. Якобсон и О. П. Самарина, *Биохимия*, 14, 1 (1949). ⁵ D. Shemin, I. M. London and D. Rittenberg, *Journ. Biol. Chem.*, 173, 799 (1948). ⁶ М. Г. Крицман, *Биохимия*, 3, 28 (1938). ⁷ Б. Н. Збарский и Н. Н. Демин, *Роль эритроцитов в обмене белков*. 1949.

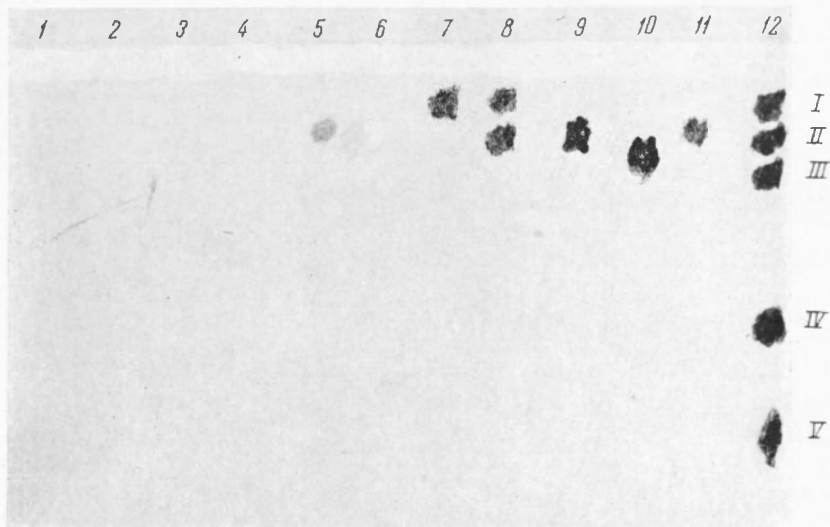


Рис. 1. Синтез аминокислот из аммиака и кетокислот в крови человека. 1—4 — контрольные пробы, 5—11 — опытные пробы, 12 — стандартная смесь аминокислот: I — аспарагиновая, II — глутаминовая, III — аминокислот адипиновая, IV — аланин, V — фенилаланин

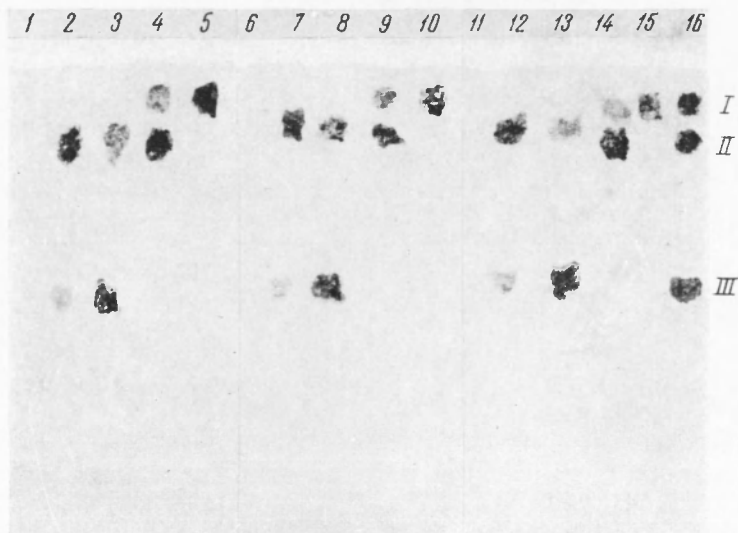


Рис. 2. Процесс переаминования в крови. 1—5 — кровь человека: 1 — контроль, 2—5 — опыт. 6—10 — кровь крысы: 6 — контроль, 7—10 — опыт. 11—15 — кровь голубя: 11 — контроль, 12—15 — опыт. 16 — стандартная смесь аминокислот: I — аспарагиновая, II — глутаминовая, III — аланин

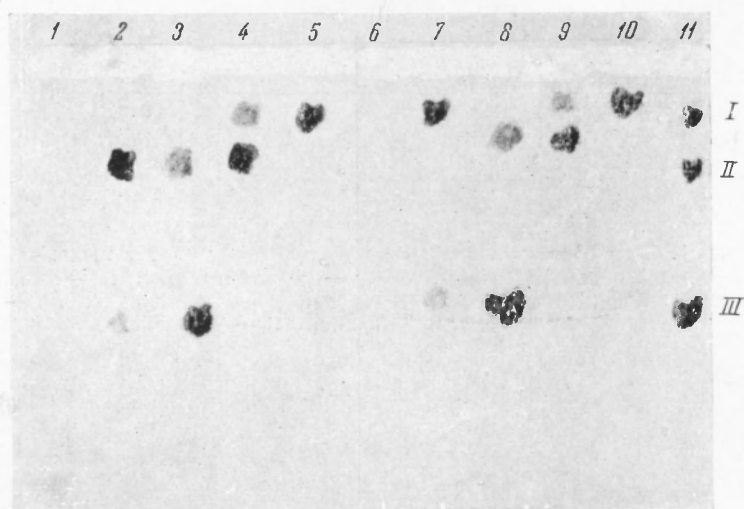


Рис. 3. Процесс переаминирования в крови. Эритроциты: I — контроль, 2—5 — опыт. Плазма: 6 — контроль, 7—10 — опыт. II — стандартная смесь аминокислот: I — аспарагиновая, II — глутаминовая, III — аланин