

Член-корреспондент АН СССР Д. Л. ФЕРДМАН и А. И. СИЛАКОВА

### О ГЛЮТАМИНАЗЕ МЫШЦ

После того как было установлено, что глутамин является постоянной составной частью мышц (1), исследования были направлены на выявление его участия в процессах обмена в мышцах при различных функциональных состояниях организма. Было установлено, что гипоксемические состояния сопровождаются снижением уровня аммиака и глутаминовой кислоты как в скелетных, так и в сердечной мышцах; содержание же глутамина при этом сохраняется на более высоком уровне (2, 3). Эти данные послужили основанием для вывода, что глутамин является одним из источников аммиака в мышцах.

Подобный вывод предполагает наличие в мышцах фермента глутаминазы, обеспечивающего дезамидирование глутамина с образованием глутаминовой кислоты и аммиака. Однако имеющимися к настоящему времени литературными данными вопрос о наличии глутаминазы в мышцах решался отрицательно. Так, Кребс (4), характеризуя объем глутаминазной активности в различных тканях, приводит величины отщепления аммиака от амидного азота глутамина, добавленного к гомогенатам из скелетных мышц морских свинок и крыс. Но, повидимому, незначительность этих величин, особенно в сравнении с величинами, характеризующими глутаминазную активность таких тканей, как печень и почки, послужила ему основанием не интерпретировать их, а это уже в дальнейшем привело к выводу об отсутствии глутаминазы в мышечной ткани.

Через некоторое время вопрос о глутаминазе мышц подвергся изучению в исследованиях С. Р. Мардашева и Н. Н. Лестровой (5). На основании полученных ими данных они пришли к выводу, что «...в поперечнополосатой и сердечной мышцах глутаминазу обнаружить не удалось». Казалось, что вопрос об отсутствии глутаминазы в мышцах мог бы считаться решенным. Однако вывод об отсутствии глутаминазы в мышцах противоречит данным, полученным при изучении превращения глутамина в скелетных и сердечной мышцах (2, 3, 6). Это побудило нас поставить в этом направлении новые эксперименты.

Наши исследования были проведены на взрослых кроликах. Постановка опытов кратко была следующей: животное умерщвляли обезглавливанием, быстро вырезывали мышцы и сердце и помещали на лед. Затем освобождали их от крови, жировой и соединительной тканей и размельчали ножницами в тонкую кашку, из которой приготавливали гомогенат, смешивая с водой в отношении 1 часть ткани + 3 части воды, и 1 мл его служил для определения наличия в мышцах глутаминазы.

Состав проб был следующим: 1 мл буфера соответствующего рН, 1 мл раствора глутамина 0,01 М (15 мг глутамина доводили водой до 10 мл, предварительно в этом же объеме нейтрализованного до рН 7,0 по бромтимолблеу, нейтрализацию проверяли в отдельных пробах), 1 мл гомогената исследуемой ткани.

В каждом опыте ставили ряд соответствующих контролей, дающих объем аммиакообразования при инкубации из реактивов (Кр), из гомогената (Кго) и из глутамина (Кгл) в результате его спонтанного расщепления (6). Отсутствующие компоненты проб в контролях — гомогенат и глутамин в Кр, глутамин в Кго и гомогенат в Кгл замещали соответствующим объемом воды. Общий объем проб был равен 3,0 мл. Все пробы помещали в водяной термостат при температуре 38—39° на 30 мин., время от времени перемешивая пробы. После окончания инкубации действие ферментов прекращали добавлением 0,2 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты. Через 10—20 мин. осадок белков удаляли центрифугированием и в определенной части безбелкового экстракта в каждой из проб определяли содержание азота аммиака. Прирост азота аммиака в полных пробах (после вычета контролей) и служил мерой активности глутаминазы. Следовательно, количество азота аммиака, обусловленное действием глутаминазы, находили из выражения

$N \text{ NH}_3$  полной пробы —  $[(N \text{ NH}_3\text{Кгл} - N \text{ NH}_3\text{Кр}) + N \text{ NH}_3\text{Кго}]$ .

Полученные в этих исследованиях данные, характеризующие величины глутаминазной активности скелетных и сердечной мышц, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Активность глутаминазы скелетных и сердечной мышц взрослых нормальных кроликов

Скелетных мышц			Сердечной мышцы		
по приросту азота аммиака в $\mu\text{г}$ на 1 г ткани за 30 мин.	$K_1$ *	$K_2$	по приросту азота аммиака в $\mu\text{г}$ на 1 г ткани за 30 мин.	$K_1$	$K_2$
35,8	3,6	0,138	54,3	7,2	0,28
40,8	4,2	0,161	82,0	10,0	0,40
49,2	5,0	0,190	100,0	15,2	0,70
29,8	3,3	0,125	95,0	11,7	0,60
50,4	5,0	0,191	82,8	9,2	0,35
48,0	4,9	0,190	75,0	8,9	0,33

\*  $K_1$  — количество азота аммиака в  $\text{мм}^3 \cdot 10^{-3}$ , отщепляющегося от амидного азота глутамината под влиянием глутаминазы на 1 мг азота ткани за 1 час.,  $K_2$  — количество аммиака в мг, отщепляющегося под влиянием глутаминазы на 100 мг азота ткани (6).

Из приведенных данных видно, что, как скелетные мышцы, так и, особенно, сердечная мышца обладают вполне измеримой глутаминазной активностью, которая, будучи выражена коэффициентом, используемым для этой цели С. Р. Мардашевым (5), представляет собой величину такого же порядка, как и глутаминазная активность таких органов, как легкие, семенники (5). Следует при этом подчеркнуть, что глутаминазная активность мышечной ткани изучалась нами в условиях инкубации проб в течение 30 мин., а не 3 час., как это имело место в опытах Мардашева.

Представляло интерес изучить некоторые свойства глутаминазы и, прежде всего, рН-оптимум ее действия. При изучении кривой рН — активность фермента мы использовали гликоколевый буфер в диапазоне величин рН от 3,4 до 9,9. Полученные данные, представляющие один из типичных опытов подобного рода, приведены на рис. 1, из которого можно видеть, что глутаминазная активность мышц имеет два совершенно отчетливых максимума: один в области рН 7,0—7,5 и второй в области рН 9,0—9,5. В этой связи интересно вспомнить, что Кребс (4)

обнаружил в различных тканях глютаминазы, отличающиеся друг от друга рН-оптимумами, а именно «печеночный тип» — рН-оптимум 6,8—7,5 и «мозговой тип» — рН-оптимум 9,0—9,5; некоторые же ткани, например почки, по его данным, содержат оба типа глютаминазы, в связи с чем кривая для этих тканей обнаруживает два максимума. Вполне возможно, что и в мышцах содержатся два типа глютаминаз, вследствие чего кривая зависимости активности от рН и обнаруживает два максимума.

Представляет интерес отметить, что при рН 8,0 глютаминаза мышц слабо активна, а часто при этом рН ее активности и вовсе не удастся обнаружить. Следует добавить, что в опытах Лушинского (7), проведенных с плацентой человека, максимальная активность глютаминазы обнаруживалась в различных буферах при рН 9,0. Следовательно, при изучении глютаминазной активности мышечной ткани, как очевидно из наших данных, а также и из имеющихся по этому вопросу литературных данных, касающихся иных тканей, наиболее рациональным является интервал значений рН от 8,5 до 9,8.

Повидимому, одной из причин того, что в опытах Мардашева и Лестровой (5) обнаруживались лишь следы глютаминазной активности в сердечной мышце, могло быть не оптимальное для этого процесса рН. Кроме того слишком длительное выдерживание проб (3 часа), содержащих мышечную кашку, в составе которой находятся разнообразные ферментные системы, могло сопровождаться частичным связыванием аммиака, образовавшегося при дезамидировании глютамина, в результате чего он ускользал от определения.

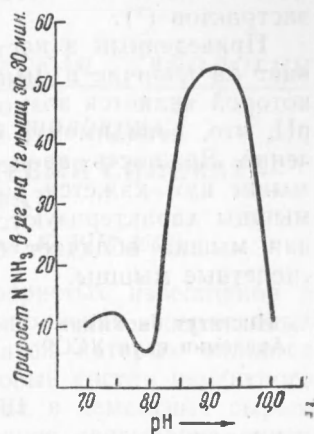


Рис. 1. Влияние концентрации водородных ионов на активность глютаминазы скелетных мышц взрослых кроликов

Таблица 2

Распределение глютаминазной активности между фракциями белков скелетных мышц кролика (прирост азота аммиака в мкг на 1 г ткани за 30 мин.)

В водном экстракте из мышц	В плотном остатке мышц	В водном экстракте из мышц	В плотном остатке мышц
2,0	37,0	10,0	32,4
5,0	42,6	13,0	32,4
4,8	24,0		

В дальнейших исследованиях мы попытались выяснить, как распределяется глютаминазная активность между воднорастворимыми и нерастворимыми в воде белками мышц. С этой целью тонко измельченную кашку из мышц на льду экстрагировали водой в отношении 1 : 3 на протяжении 10—20 мин. После этого центрифугированием разделяли экстракт и плотную массу нерастворимых белков. Слитый экстракт возмещали таким же объемом воды и, как описано выше, в оптимальных условиях определяли величины глютаминазной активности водного экстракта мышц и их плотного остатка. Эти данные приведены в табл. 2.

Как можно видеть из приведенных данных, глютаминаза мышц находится в фракции белков, не растворимых в воде. Значительная часть

глутаминазной активности скелетных мышц сохраняется в плотном остатке их после 20-минутного экстрагирования водой. В водном экстракте определяются лишь незначительные количества ее. В этом отношении глутаминаза мышц отлична от глутаминазы таких тканей, как мозг, ретина, почки, которая, по данным Кребса (<sup>4</sup>), легко переходит в водные экстракты этих тканей и схожа с глутаминазой плаценты человека, активность гомогенатов которой в два раза выше, чем активность водных экстрактов (<sup>7</sup>).

Приведенный в настоящем сообщении фактический материал указывает на наличие в мышцах глутаминазы, существенной особенностью которой является возможность действия в широком диапазоне значений рН, что, по видимому, может иметь определенное физиологическое значение. Важность процесса дезамидирования глутамина для функции мышц нам кажется очевидной из того, что функционально различные мышцы характеризуются различной активностью глутаминазы. Сердечная мышца обладает более высокой глутаминазной активностью, чем скелетные мышцы.

Институт биохимии  
Академии наук УССР

Поступило  
24 VII 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. Л. Фердман, С. Р. Френкель, А. И. Силакова, Биохимия, **7**, 4 (1942). <sup>2</sup> Д. Л. Фердман, А. И. Силакова, ДАН, **80**, 657 (1951). <sup>3</sup> А. И. Силакова, Укр. биохим. журн., **24**, 354 (1952). <sup>4</sup> Н. А. Krebs, Biochem. J., **29**, 1951 (1935). <sup>5</sup> С. Р. Мардашев, Н. Н. Лестровая, Вопросы мед. хим., **1**—**2**, 203 (1949). <sup>6</sup> А. И. Силакова, Укр. биохим. журн., **23**, 76 (1951). <sup>7</sup> H. L. Luschinsky, Arch. Biochem. et Biophys., **31**, 132 (1951).