

Д. М. ГЕВОРКЯН, М. Г. КОЧАРЯН

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ФОРМ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

В эволюционно-сравнительном аспекте наличие аргиназы показано в мозгу не только уреотелических, но даже аммоно- и урикотелических животных [5].

На основании проведенных опытов, а также анализа многочисленных литературных данных Бунятяном и Давтяном [1, 2], было сделано заключение о том, что существуют две различные аргиназы: одна—неуреотелическая, не связанная с механизмами нейтрализации аммиака и широко представленная в животном мире. другая—уреотелическая, присутствующая в печени лишь уреотелических животных и участвующая в механизме нейтрализации аммиака.

Если «неуреотелическая аргиназа» имеет общебиологическое значение, логично было ожидать наличия двух форм аргиназы в печени уреотелических животных. Хроматографией экстракта печени на колонке с КМ-целлюлозой, а также при фракционировании экстракта печени крыс на колонке с сефадексом G-200 удалось получить два пика аргиназной активности, что является веским доказательством наличия в печени уреотелических животных, помимо основной аргиназы, низкомолекулярной формы фермента [3].

Мы задались целью исследовать влияние конкурентных ингибиторов аргиназы на активность выделенных нами из печени крыс двух форм ее.

После многократного фракционирования экстракта печени крыс на колонке с сефадексом G-200 фракции, соответствующие максимуму аргиназной активности обоих пиков, сливали вместе и хранили в холодильнике при -4°C . В общей сложности нами было собрано около 300 мл фракции (большой пик аргиназной активности), соответствующей «уреотелической аргиназе» и 90 мл фракции (малый пик), соответствующей «неуреотелической аргиназе».

Константы ингибирования определялись графическим методом Диксона [4]. L-аргинин применяли в следующих концентрациях: 0,0111, 0,0223, 0,0446 М. Конкурентные ингибиторы аргиназы L-лизин и L-орнитин [6] были взяты в концентрациях 0,0111, 0,0223, 0,0446, 0,0669 и 0,134 М. Все субстраты растворяли в 0,1 М глициновом буфере, рН 9,5. Аргиназную активность определяли по Зелингсону [7]. Инкубационная смесь состояла из 1,4 мл ферментного раствора, 0,5 мл глицинового буфера, 0,2 мл

0,025 М $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$. После 15-минутной инкубации добавляли по 0,5 мл L-аргинина в соответствующих концентрациях.

Таблица 1

Действие различных концентраций L-лизина на активность печеночной аргиназы, соответствующей малому пику, мМ на 1 мг белка

Субстрат	Контроль	Концентрация ингибитора (L-лизин)				
		0,0111 М	0,0223 М	0,0446 М	0,0669 М	0,134 М
L-аргинин 0,0111 М	0,9	0,86	0,9	0,92	0,92	0,9
L-аргинин 0,0223 М	0,9	0,9	0,92	0,9	0,92	0,86
L-аргинин 0,0446 М	0,82	0,82	0,86	1,0	0,9	0,92

Как видно из табл. 1, аргиназная активность, соответствующая малому пику печеночной аргиназы, не ингибируется L-лизином при всех примененных концентрациях субстрата L-аргинина. Так, если в контроле аргиназная активность малого пика при наличии L-аргинина в концентрации 0,0111 М равна 0,9 мМ на 1 мг белка, то при добавлении различных концентраций L-лизина она колеблется в пределах 0,86—0,92 мМ на 1 мг белка.

Таблица 2

Действие различных концентраций L-орнитина на активность печеночной аргиназы, соответствующей малому пику, мМ на 1 мг белка

Субстрат	Контроль	Концентрация ингибитора (L-орнитин)				
		0,0111 М	0,0223 М	0,0446 М	0,0669 М	0,134 М
L-аргинин 0,0111 М	1,14	1,18	1,22	1,14	1,22	1,22
L-аргинин 0,0223 М	1,18	1,14	1,14	1,14	1,14	1,18
L-аргинин 0,0446 М	1,22	1,18	1,14	1,18	1,22	1,22

Из табл. 2 явствует, что различные концентрации L-орнитина также не оказывают действия на активность выделенного нами пика печеночной аргиназы. В контроле аргиназная активность малого пика равна 1,14 мМ на 1 мг белка при концентрации L-аргинина 0,0111 М, а при добавлении L-орнитина в различных концентрациях она колеблется в пределах 1,14—1,22 мМ на 1 мг белка.

Данные, полученные при определении печеночной аргиназы, соответствующей большому пику в присутствии различных концентраций L-лизина, показали, что в присутствии различных концентраций субстрата аргиназная активность заметно тормозится, причем при повышении концентрации ингибитора свыше 0,0446 М дальнейшего ингибирования не наблюдается (рис. 1).

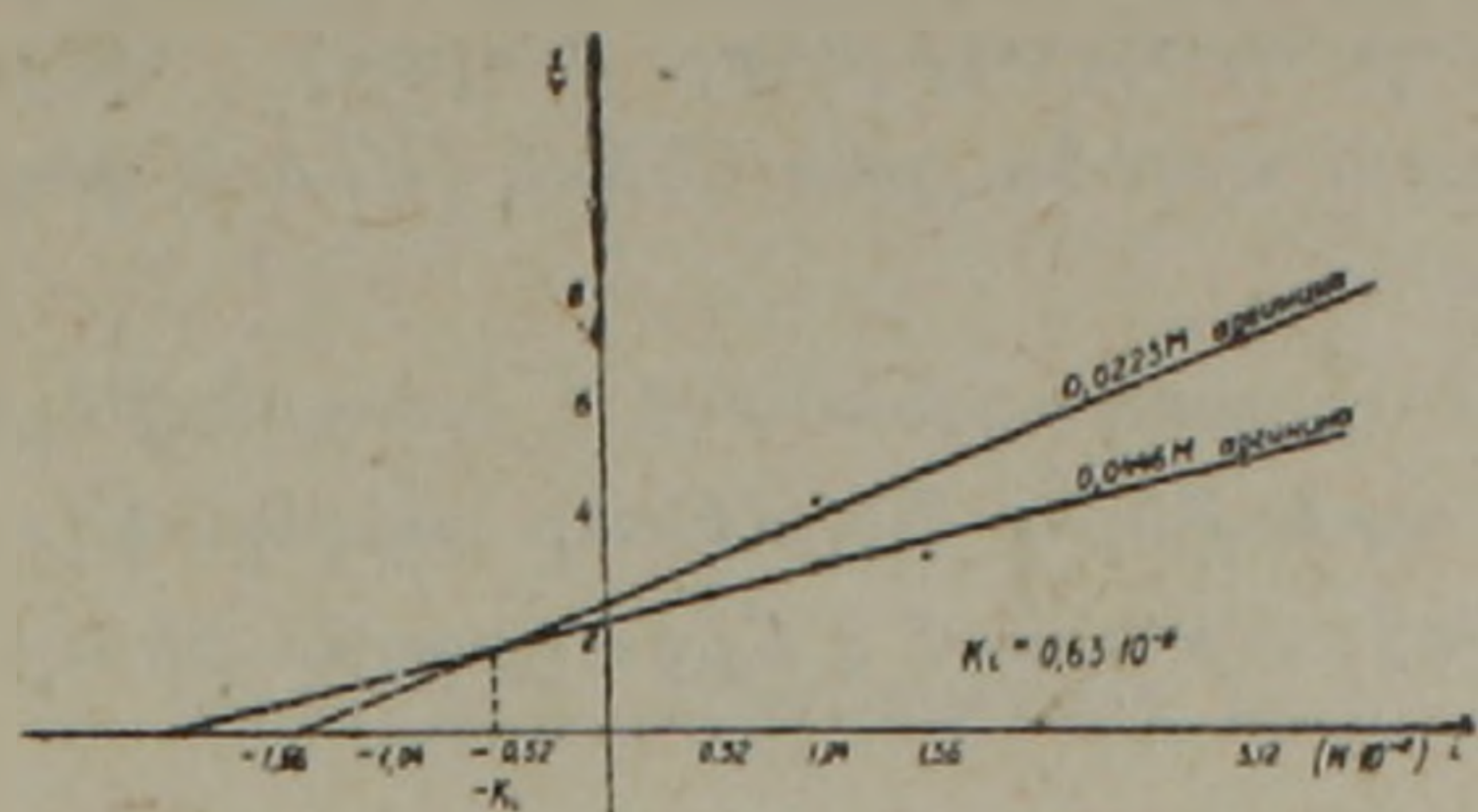


Рис. 1.

Рис. 1. Кривые ингибирования аргиназы под влиянием различных концентраций L-лизина по Диксону. V —активность фермента, i —концентрация ингибитора, K_i — константа ингибирования.

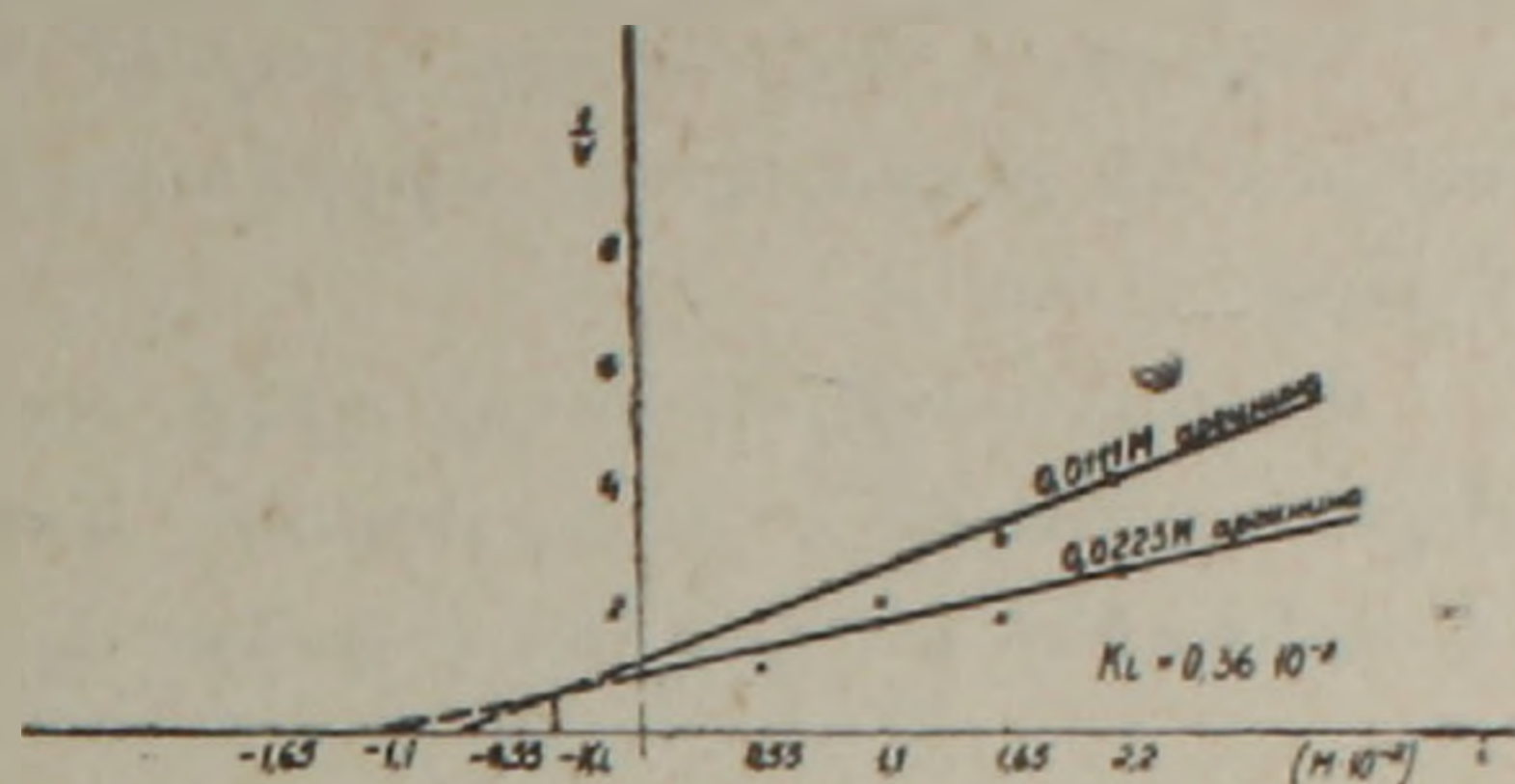


Рис. 2.

Рис. 2. Кривые ингибирования аргиназы под влиянием различных концентраций L-орнитина по Диксону. V —активность фермента, i —концентрация ингибитора, K_i — константа ингибирования.

Как видно из рисунка, обе прямые, изображающие ингибирование ферментов при различных концентрациях L-аргинина, сходятся в одной точке. Вычисление константы ингибирования показало, что она в наших условиях опыта равна $0,63 \cdot 10^{-2}$ М.

L-орнитин в различных концентрациях также оказывает ингибирующее действие на активность аргиназы печени крыс, соответствующую большому пику при концентрациях L-аргинина 0,0111 М и 0,0223 М.

Графическое изображение полученных данных приведено на рис. 2, из которого явствует, что константа ингибирования в случаях орнитина равна $0,36 \cdot 10^{-2}$ М.

Таким образом, две формы аргиназы, выделенные из печени крыс, по-разному реагируют на присутствие конкурентных ингибиторов аргиназы—L-лизина и L-орнитина. Если функция, соответствующая «неуреотелической аргиназе» (малый пик), не ингибируется L-лизином и L-орнитином, то фракция, соответствующая «уреотелической аргиназе» (большой пик), значительно ингибируется в присутствии обоих ингибиторов.

Итак, полученные данные могут быть оценены как доказательство наличия различных механизмов регуляции активности двух форм аргиназы.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 26.1 1972 г.

Г. И. ГЕВОРГЕЗЯН, И. Г. ФЕДЯКИН

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻՅ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԱՐԴԻՆԱԶԱՅԻ
ԵՐԿՈՒ ԶԵՎԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել են արգինազայի մրցակցային արգելակիչներ՝ L-օրնիտինի և L-լիզինի ազդեցությունը յարդից անջատված արգինազային երկու մոնոկոպար ձևերի վրա:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ արգելակիչները տարբեր ազդեցություն են ցուցաբերում արգինազայի երկու մոլեկուլյար ձևերի (մեծ և փոքր պիկերի) վրա:

Ի տարբերություն փոքր պիկի, որը համապատասխանում է անուրեթեիկ արգինազանային և չի արգելվում, մեծը՝ ուրեթեիկ ֆերմենտը արգելակվում է L-օրնիտինի և L-լիզինի կողմից: Արգելակումը կրում է մրցակցային բնույթ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х., Давтян М. А., Геворкян Д. М. ДАН АрмССР, 50, 3, 1970.
2. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга, 4, Ереван, 1968.
3. Давтян М. А., Бунятян Г. Х., Геворкян Д. М., Петросян Л. А. Вопросы биохимии мозга, 6, 1970.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, изд. «Мир», М., 1966.
5. Buniatian H. Ch, a, Davtian M. A. J. Neurochem., 13, 1966.
6. Hunter A. a. Downs C. E. J. Biol. Chem., 157, 427, 1945.
7. Selingson D. a. Sellingson H. J. Lab. a. Clin. Med., 38, 1951.