

Ж. Г. САРУХЛЯНИ, Л. А. ПЕТРОСЯНИ, Р. С. БАБЛОЯНИ, М. А. ДАВТЯНИ

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АРГИНАЗЫ И γ -ГУАНИДИНО- БУТИРАТ-УРЕОГИДРОЛАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС И КУР

В работе изучалась субклеточная локализация аргиназы и γ -гуанидинобутират-уреогидролазы в тканях крыс и кур. В данных указывается, что аргиназа из печени кур и мозговая аргиназа крыс локализованы в ядерной фракции. В почках крыс и кур, а также в мозгу кур она имеет ядерно-митохондриальную локализацию.

Полученные данные позволяют заключить, что аргиназа в тканях кур и крыс (кроме печеночной аргиназы крыс) имеет в основном ядерно-митохондриальную локализацию и не связана с механизмом обезвреживания аммиака.

Вопросам внутриклеточной локализации аргиназы посвящено довольно много работ. Установлено, что уреотелическая аргиназа в основном локализована во фракции цитоплазмы [3, 15]. Исследования последних лет показали, что аргиназа печени крыс преимущественно локализована в микросомальной фракции [11]. Данные же относительно субклеточной локализации неуреотелической аргиназы, широко представленной в природе и имеющей, вероятно, общебиологическое значение [1], отсутствуют.

В предыдущей нашей публикации было доказано, что в мозговой ткани крыс аргиназа локализована в основном в ядерной фракции [2]. Представляет определенный интерес изучение внутриклеточной локализации γ -гуанидинобутират-уреогидролазной активности в печени кур. Этот фермент, обнаруженный в печени и в почках ряда урикотелических животных—кур, змей, ящериц [12], в печени акулых рыб [5—7], в гепатопанкреасе виноградной улитки [13], в некоторых органах кролика [4, 14], у некоторых млекопитающих [12], бактерий [17, 18], мало изучен. Хотя наличие указанной активности полностью доказано, тем не менее существование индивидуального фермента нельзя считать установленным, так как при многочисленных попытках выделения и очистки фермента γ -гуанидинобутират-уреогидролазы было установлено, что полученные препараты обладают и некоторой аргиназной активностью. Это обстоятельство не исключает возможности существования изофермента аргиназы, обладающего γ -гуанидинобутират-уреогидролазной активностью. Параллельное определение субклеточной локализации аргиназы и γ -гуанидинобутират-уреогидролазной активности в печени кур могло бы внести некоторую ясность. С этой точки зрения нами было обращено внимание на данные Порембской и сотр. относительно того, что в гепатопанкреасе виноградной улитки γ -гуанидинобути-

рат-уреогидролазная активность сосредоточена в митохондриях, в которых имеется и 30% обнаруженной аргиназной активности.

В данной работе нами изучалась субклеточная локализация аргиназы в различных тканях крыс и кур, а также γ -гуанидинобутират-уреогидролазы в печени кур.

Методика. Опыты проводились на белых крысах (весом 120—160 г) и курах породы Леггорн (7—9-месячные). Субклеточные элементы печени и почек были получены методом Шнейдера и Хогебума [16]. При этом была выделена не отдельная микросомальная фракция, а объединенная фракция микросом и гиалоплазмы. Фракционирование гомогенатов головного мозга проводилось по методу Броди и Бейн [8]. Аргиназная и γ -гуанидинобутират-уреогидролазная активности определялись в гомогенатах и в субклеточных фракциях путем инкубирования при 37°C 60 мин (глициновый буфер 0,04 М, рН-9,5), в присутствии L-аргинина или γ -гуанидинобутирата (50 мкмоль).

В первой серии опытов исследовалась субклеточная локализация аргиназы в органах крыс.

Таблица 1

Локализация аргиназной активности в субклеточных частях гомогената головного мозга крыс (приrost мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Микросомы | Гиалоплазма |
|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------|-----------|-----------------|
| 1 | 8,84 | 4,66 | 0,64 | 0,42 | 0 | 0,86 |
| 2 | 10,44 | 4,92 | 0,42 | 0,42 | 0 | 1,18 |
| 3 | 9,64 | 4,60 | 0,64 | 0,32 | 0 | 1,28 |
| 4 | 10,71 | 6,21 | 0,53 | 0,48 | 0 | 1,01 |
| 5 | 9,60 | 4,28 | 0,58 | 0,69 | 0 | 1,71 |
| 6 | 9,07 | 6,30 | 0,59 | 0,21 | 0 | 0,69 |
| 7 | 9,10 | 4,92 | 0,77 | 0,37 | 0 | 0,70 |
| 8 | 9,06 | 6,18 | 0,53 | 0,48 | 0 | 0,99 |
| 9 | 10,17 | 4,89 | 0,48 | 0,42 | 0 | 1,23 |
| $M \pm m$ | $9,60 \pm 0,22$ | $5,21 \pm 0,26$ | $0,57 \pm 0,034$ | $0,42 \pm 0,0043$ | 0 | $1,07 \pm 0,11$ |

Из табл. 1 видно, что в отдельных структурных элементах нам удалось суммарно обнаружить около 76% исходной активности гомогената, что связано, по-видимому, с некоторой инактивацией фермента в процессе фракционирования. Приведенные в таблице данные ясно показывают, что основная активность аргиназы сосредоточена не во фракции гиалоплазмы, а в ядерной фракции.

Активность фермента во фракции ядер составляет 72% общей обнаруженной активности, а во фракции гиалоплазмы—только 15%. В митохондриальной фракции и промывной жидкости, содержащих в основном тяжелые митохондрии, локализовано соответственно 5,7 и 7,8% активности фермента, в микросомальной фракции его активность отсутствует. Полученные данные позволяют заключить, что мозговая аргиназа, в отличие от печеночного фермента, является не цитоплазматическим, а преимущественно ядерным ферментом.

В почках крыс аргиназная активность, как это наглядно показано в табл. 2, в основном локализована во фракции митохондрий (33,1%) и ядер (32,6%), а в гиалоплазме обнаруживается всего 21,1% ее. Итак, и в клетках почек крыс аргиназа не является цитоплазматическим ферментом.

Таблица 2
Локализация аргиназной активности в субклеточных частицах гомогената почек крыс (прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Гиалоплазма |
|---------------|---------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 157 | 58,6 | 12,8 | 53,8 | 32,4 |
| 2 | 170 | 56,4 | 15,6 | 49,6 | 30,0 |
| 3 | 184 | 50,4 | 25,6 | 54,4 | 30,1 |
| 4 | 148 | 61,0 | 22,0 | 58,8 | 28,0 |
| 5 | 184 | 55,6 | 21,6 | 43,2 | 25,0 |
| 6 | 184 | 52,8 | 16,8 | 42,4 | 25,8 |
| 7 | 234 | 46,0 | 20,4 | 60,0 | 42,8 |
| 8 | 188 | 52,1 | 23,6 | 50,4 | 34,8 |
| 9 | 216 | 34,8 | 24,8 | 49,2 | 40,1 |
| 10 | 216 | 40,4 | 22,4 | 54,2 | 38,4 |
| $M \pm m$ | $186 \pm 9,6$ | $50,8 \pm 2,61$ | $20,6 \pm 1,31$ | $51,6 \pm 1,85$ | $32,8 \pm 1,93$ |

Во второй серии опытов исследовалась субклеточная локализация аргиназы в органах кур.

Таблица 3
Локализация аргиназной активности в субклеточных частицах гомогената печени кур (прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Гиалоплазма |
|---------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 4,3 | 4,7 | 0,48 | 1,05 | 0,75 |
| 2 | 3,2 | 2,7 | 0,40 | 1,12 | 0,85 |
| 3 | 5,64 | 5,3 | 0,69 | 1,30 | 0,70 |
| 4 | 4,3 | 3,6 | 0,40 | 0,78 | 0,90 |
| 5 | 4,6 | 4,8 | 0,50 | 0,65 | 0,73 |
| 6 | 6,0 | 4,9 | 0,68 | 1,20 | 0,70 |
| 7 | 3,3 | 3,9 | 0,58 | 1,10 | 0,77 |
| 8 | 4,9 | 3,7 | 0,46 | 0,70 | 0,71 |
| $M \pm m$ | $4,53 \pm 0,35$ | $4,2 \pm 0,30$ | $0,52 \pm 0,04$ | $0,98 \pm 0,08$ | $0,76 \pm 0,03$ |

Данные табл. 3 убеждают, что в печени кур, как в мозгу крыс, аргиназная активность локализована в ядерной фракции — 65% ее. Во фракциях митохондрий и промывной жидкости содержится 15,2 и 8% активности соответственно, а во фракции гиалоплазмы — всего 11,8%. Примечательно, что суммарная активность аргиназы всех фракций гомогената печени кур почти во всех опытах выше цельного гомогената. Это некоторое активирование аргиназы после дифференциального центрифугирования наводит на мысль о существовании ингибитора в одной из полученных фракций. В связи с этим следует отметить, что имеются ра-

боты, в которых показано ингибирование активности аргиназы экстрактами печени цыплят. Установлено, что при добавлении гомогената печени цыплят к равному объему гомогената печени крыс в последнем активность аргиназы понижается на 27%, а при добавлении L-цистеина (10 мкмоль/200 мг ткани), напротив, фермент активируется на 20% [10]. Дальнейшие исследования показали, что этот фактор ингибирования является термостабильным соединением, но идентифицировать его пока не удалось [9].

Таблица 4
Локализация аргиназной активности в субклеточных частицах гомогената мозга кур
(прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Гиалоплазма |
|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------------|----------------|
| 1 | 11,7 | 1,5 | 2,3 | 5,4 | 1,8 |
| 2 | 12,2 | 1,4 | 2,8 | 4,9 | 2,0 |
| 3 | 16,2 | 2,2 | 1,1 | 5,0 | 1,4 |
| 4 | 11,8 | 0,9 | 1,2 | 5,3 | 1,5 |
| 5 | 16,3 | 0,8 | 2,6 | 7,4 | 1,6 |
| 6 | 15,3 | 2,1 | 1,0 | 5,4 | 2,1 |
| 7 | 13,8 | 0,8 | 2,4 | 7,4 | 0,9 |
| 8 | 15,7 | 0,85 | 1,3 | 4,9 | 1,2 |
| $M \pm m$ | $14,1 \pm 0,70$ | $1,44 \pm 0,19$ | $1,83 \pm 0,26$ | $5,7 \pm 0,33$ | $1,6 \pm 0,14$ |

В мозговой ткани кур, как это наглядно видно из табл. 4, аргиназная активность локализована преимущественно во фракциях митохондрий и промывной жидкости (53,9 и 17,3% соответственно), во фракциях гиалоплазмы и ядер она распределена равномерно (15,1 и 13,6% соответственно) и значительно уступает таковой в митохондриальной фракции.

В почечной ткани кур (табл. 5) аргиназная активность в основном локализована во фракции ядер (42,8%) и митохондрий (46,2%), лишь 7,8% ее обнаружено в промывной жидкости и 3,1% в гиалоплазме.

Таблица 5
Локализация аргиназной активности в субклеточных частицах гомогената почек кур
(прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Гиалоплазма |
|---------------|----------------|--------------|--------------------|--------------|----------------|
| 1 | 1665 | 870 | 111 | 890 | 70,0 |
| 2 | 960 | 895 | 117 | 955 | 80,0 |
| 3 | 1035 | 320 | 156 | 425 | 20,6 |
| 4 | 1725 | 655 | 100 | 785 | 32,5 |
| 5 | 1215 | 675 | 85 | 760 | 45,0 |
| 6 | 1635 | 315 | 156 | 420 | 27,5 |
| 7 | 1335 | 615 | 92 | 570 | 45,0 |
| 8 | 1695 | 625 | 95 | 555 | 47,5 |
| $M \pm m$ | 1408 ± 111 | 621 ± 76 | 114 ± 10 | 670 ± 64 | $45,9 \pm 7,1$ |

Таким образом, почечные ткани крыс и кур принципиально не отличаются по внутриклеточной локализации аргиназной активности.

В следующей серии опытов исследовалась субклеточная локализация γ -гуанидинобутират-уреогидролазы в печени кур.

Таблица 6

Локализация γ -гуанидинобутират-уреогидролазной активности в субклеточных частицах гомогената печени кур (прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани)

| Номера опытов | Гомогенат | Ядра | Промывная жидкость | Митохондрии | Гиалоплазма |
|---------------|------------------|-----------------|--------------------|----------------|----------------|
| 1 | 196 | 156 | 3,9 | 9,1 | 7,5 |
| 2 | 206 | 158 | 3,9 | 8,8 | 8,0 |
| 3 | 176 | 152 | 8,6 | 7,7 | 7,8 |
| 4 | 200 | 150 | 8,0 | 8,0 | 7,8 |
| 5 | 174 | 130 | 8,4 | 9,0 | 4,0 |
| 6 | 178 | 148 | 8,4 | 9,2 | 4,2 |
| 7 | 184 | 152 | 7,7 | 11,8 | 6,8 |
| 8 | 152 | 146 | 8,0 | 11,0 | 7,0 |
| 9 | 144 | 110 | 8,1 | 8,0 | 6,6 |
| 10 | 154 | 110 | 8,3 | 7,8 | 6,8 |
| 11 | 128 | 110 | 11,8 | 9,1 | 11,6 |
| 12 | 132 | 104 | 11,7 | 10,0 | 11,4 |
| $M \pm m$ | $156,66 \pm 8,3$ | $135,5 \pm 6,2$ | $8,0 \pm 0,72$ | $9,18 \pm 0,3$ | $7,46 \pm 0,7$ |

Как показывают данные табл. 6, субклеточная локализация этого фермента почти совпадает с локализацией аргиназы: основная часть, 80%, обнаруживается во фракции ядер, а во фракциях митохондрий и промывной жидкости всего 5,9 и 5,7% соответственно. Интересно, что подобно аргиназной, суммарная активность γ -гуанидинобутират-уреогидролазы всех фракций выше цельного гомогената. По-видимому, высказанное выше предположение о существовании ингибитора аргиназы в равной мере относится и к γ -гуанидинсбутират-уреогидролазе. Подобное совпадение внутриклеточной локализации и некоторое активирование после дифференциального центрифугирования обоих ферментов углубляет наше сомнение относительно существования изофермента аргиназы, обладающего также и γ -гуанидинобутират-уреогидролазной активностью.

Для окончательного вывода необходимы дальнейшие исследования, в частности очистка и изучение некоторых физико-химических параметров этого фермента.

Совокупность наших данных позволяет прийти к заключению, что, вопреки укоренившемуся взгляду в отношении аргиназы как цитоплазматического фермента, аргиназа в большинстве тканей крыс и кур, кроме печени крыс, в действительности не обладает цитоплазматической локализацией: она является скорее митохондриальным и ядерным ферментом. Цитоплазматической является лишь аргиназа печени крыс, где находятся все ферменты орнитинового цикла. Можно утверждать, что обнаруженная активность в митохондриях и ядрах не связана с механизмами обезвреживания аммиака, так как она не сочетается с другими ферментами орнитинового цикла. Этот вывод полностью согласуется с выдвинутым Г. Х. Бунятыном и М. А. Дазтыном положением о существо-

ванин в природе двух форм аргиназ: уреотелической, встречающейся в печени уреотелических животных и являющейся цитоплазматическим ферментом, и неуреотелической, присутствующей почти во всех тканях животных и не связанной с механизмами нейтрализации аммиака.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 10.1 1973 г.

Ժ. Գ. ՍԱՐՈՒԽԱՆՅԱՆ, Լ. Ա. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ռ. Ս. ԲԱԲԼՈՅԱՆ, Մ. Ա. ԳԱՂԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԵՎ γ -ԳՈՒԱՆԻԴԻՆՈՐՈՒՄՆԵՐԱՏ-ՈՒՐԵՆՈՇԻԴՐՈՂԱԶԱՅԻՆ
ՆԵՐՔՁՁԱՅԻՆ ԼՈԿԱԼԻԶԱՅԻԱՆ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԵՎ
ՀԱՎԵՐԻ ՀՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է սպիտակ առնետների և հավերի հյուսվածքներում արգինազային և γ -գուանիդինորուտիրատ-ուրեոհիդրոլազային ակտիվությունների ներքջային լոկալիզացիան:

Տվյալները ցույց են տալիս, որ արգինազային ակտիվությունը հավերի լյարդում, ինչպես և առնետների ուղեղում, լոկալիզացված է կորիզային ֆրակցիայում: Հավերի և առնետների երիկամնային հյուսվածքները, ինչպես նաև հավերի ուղեղային հյուսվածքը, ունեն արգինազային կորիզա-միտոքոնդրիալ տեղաբաշխում: Հավերի լյարդի γ -գուանիդինորուտիրատ-ուրեոհիդրոլազան, ինչպես նաև արգինազան ունեն հիմնականում կորիզային լոկալիզացիա:

Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ արգինազան հավերի և առնետների հյուսվածքներում (բացի առնետների լյարդից, որն ունի ցիտոպլազմատիկ լոկալիզացիա) հիմնականում ունի կորիզա-միտոքոնդրիալ լոկալիզացիա և կապ չունի ամիակի շեղորացման մեխանիզմի հետ (օրնիտինային ցիկլի բացակայություն պատճառով):

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х., Давтян М. А. II Всесоюзн. биохим. съезд, Ташкент, 1969.
2. Давтян М. А., Петросян Л. А. Биологический журнал Армении, XXIII, 5, 1970.
3. Ковальский В. М. ДАН СССР, 182 (6), 1968.
4. Akamatsu a. Kobayashi. J. Biochem. (Japan), 38, 1951.
5. Baret R., Morgue M. et al. C. R. Soc. Biol., 158, 10, 1964.
6. Baret R. et al. C. R. Soc. Biol., 159, 4, 1965.
7. Baret R. et al. C. R. Soc. Biol., 165, 10, 1966.
8. Brodl J. M. a. Baln I. A. J. Biol. Chem., 195, 1952.
9. Della Pietra a. Illiano. Life Sci, 6, 1964.
10. Illiano et al. Biochem. Appl., 13, 1967.
11. Mora J. et al. Biochem., J., 96, 1965.
12. Mora J. et al. Biochem., J., 96, 1965.
13. Porembska Z. et al. Acta Biochem. Pol., 15, 2, 1968.
14. Sano M. J. Biochem. (Japan), 33, 1941.
15. Schlmke R. T. J. Biol. Chem., 237, 1962.
16. Shneider N. O. a. Hogeboom G. H. J. Biol. Chem., 204, 1953.
17. Thoal N. V. et al. Biochem. Bioph. Acta, 63, 1962.
18. Thoal N. V. et al. Biochem. Bioph. Acta, 115, 1966.