

Г. А. АСЛАНЯН, М. А. ДАВТЯН

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА АРГИНАЗЫ ПОЧЕК КРЫС

Изучалось поведение аргиназы почек крыс при ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Предварительно был разработан способ перевода фермента в растворимое состояние. При хроматографии экстракта почек с КМ-целлюлозой аргиназа выявляется одним пиком, а при гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 выявляются два четко ограниченных пика аргиназной активности.

На основании анализа большого экспериментального и литературного материала в настоящее время обосновано положение о существовании двух различных форм аргиназ. Одна из них—уреотелическая, присутствующая в печени уреотелических животных и участвующая в механизме нейтрализации аммиака, другая—неуреотелическая, не связанная с механизмами нейтрализации аммиака и широко представленная в биологическом мире. Очевидно, последний фермент—эволюционно более древний и имеет свои самостоятельные функции независимо от уреотелизма [2, 4, 5]. Предполагается возможное участие аргиназы в регуляции биосинтеза гистонов, поддержании оптимального уровня в тканях некоторых биологически активных соединений (аргининосукцинат, цитруллин,  $\gamma$ -гуанидиномасляная кислота,  $\beta$ -гуанидинопропионовая кислота, гликоциамин и другие гуанидиновые соединения) [3, 4], снабжении процесса биосинтеза пролина орнитином [1, 9, 16] и другие.

В свете этих соображений оправдан интерес к изучению неуреотелической аргиназы. В этом отношении недостаточно изучена аргиназа почек уреотелических животных, активность которой была выявлена еще в 1924 году [8]. Известно, что почечная аргиназа, в отличие от печеночной, не является цитоплазматическим ферментом, она локализована в основном в митохондриальной фракции клетки [7, 10]. Изучены также некоторые адаптивные свойства этого фермента. При длительном голодании при введении гидрокортизона или тестостерона значительно активизируется аргиназа почек [6, 11]. По-видимому, фермент почечной ткани крыс является неуреотелическим, так как в почках представлены не все ферменты орнитинового цикла [15]. С другой стороны, по данным некоторых авторов, почечная аргиназа по некоторым физико-химическим показателям ( $K_m$ , ингибирование избытком субстрата, молекулярный вес и др.), близка к уреотелической печеночной аргиназе [12], что, однако, оспаривается другими исследователями [10, 16]

Для более глубокого изучения почечной аргиназы крыс нами исследовался изоэнзимный спектр фермента. Следует отметить, что имеющиеся по этому вопросу литературные данные противоречивы. Согласно исследованиям Поремской [14], при хроматографировании экстракта почек на ДЕАЕ-целлюлозе обнаруживаются два изофермента аргиназы, тогда как, по данным других исследователей, при хроматографировании как на ДЕАЕ-целлюлозе, так и на КМ-целлюлозе аргиназная активность проявляется в виде одного пика [10].

*Материал и методика.* Опыты проводились на белых крысах весом 150—200 г. Животных декапитировали, быстро извлекали почки, промывали холодной водой и готовили гомогенат в стеклянном гомогенизаторе типа Потер-Элведжема. Для определения аргиназной активности к 1 мл исследуемого раствора добавляли 5 мкМ раствора  $MnCl_2$  (0,2 мл  $H_2O$ ) и 1,4 мл 0,04 М глицинового буфера (рН 9,5), прединкубировали 5 мин в атмосфере воздуха при  $37^\circ C$ , добавляли 150 мкМ L-аргинаина (0,4 мл глицинового буфера, рН 9,5). После 20-минутной инкубации реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 20% раствора ТХУ, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли мочевины методом Арчибальда [13]. В первой серии опытов была поставлена задача перевести почечную аргиназу в растворимое состояние, ибо она, в отличие от печеночной, как отмечалось выше, локализована преимущественно в митохондриальной фракции. С этой целью гомогенат подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию, после чего центрифугировали при 18000 об/мин—30 мин. Однако этим путем удавалось перевести в раствор не более 40% активности фермента, несмотря на применение различных растворителей ( $H_2O$ , малеинатный буфер), отсутствие и наличие различных концентраций солей марганца.

При подогревании гомогенатов ( $55^\circ C$  10 мин), приготовленных на 0,005 М малеинатном буфере, рН 7,0 (5,8 г малеиновой кислоты и 11,84 г  $KCl$  в 1000 мл воды, содержащей 0,03 М  $MnCl_2$ ), более 70% активности фермента переходит в супернатант. Полученный таким образом активный экстракт фракционировался на колонках с КМ-целлюлозой и сефадексом G75. Другим исследователям удалось экстрагировать почечный фермент крыс обработкой ультразвуком предварительно замороженного и оттаянного гомогената [10].

В первую очередь мы проводили хроматографирование экстракта на колонке с КМ-целлюлозой. (Колонка  $1,5 \times 30$  см, уравновешенная против 0,0005 М трис-буфера, рН 7,4, элюция—градиентная, этим же буфером при постоянном повышении молярности от 0 до 0,25 М  $KCl$ , скорость элюции—24 мл/час, объем фракции 4 мл). Гель-фильтрацию экстракта проводили на колонках с сефадексом G-75. На колонку наносили 3,5 мл экстракта 14% гомогената (колонка  $2 \times 50$  см), уравновешение и элюция—0,002 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0, скорость элюции—48 мл/час, объем фракции—4 мл).

*Результаты и обсуждение.* Результаты хроматографии приведены на рис. 1. Как видно из рис., при хроматографировании экстракта почек крыс обнаруживается один пик аргиназной активности, элюируемый 0,05 М—0,1 М  $KCl$ . Таким образом, хроматографией на КМ-целлюлозе, как отмечалось и другими авторами [10], изоэнзимы аргиназы почечной ткани не обнаруживаются. Как показано на рис. 2, при гель-фильтрации экстракта почек крыс выявляются два четко ограниченных пика аргиназной активности. Максимум первого пика, фильтрующегося низкомолекулярными белками, находится во фракциях 8—9, а второго—во фракции 20, причем активность первого пика в 4—5 раз превышает активность второго.

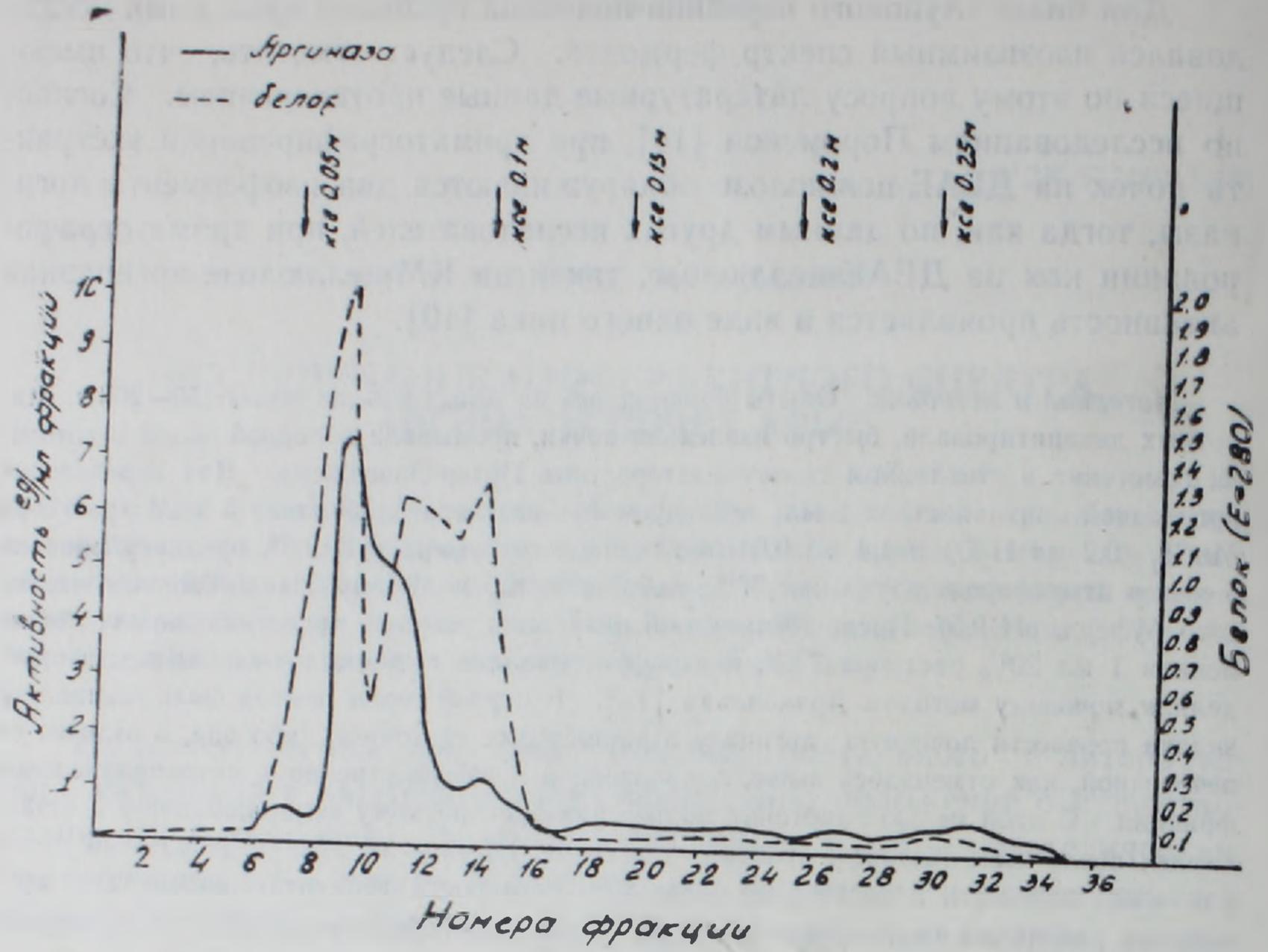


Рис. 1. Фракционирование аргиназы экстракта почек крыс на колонке с КМ-целлюлозой.

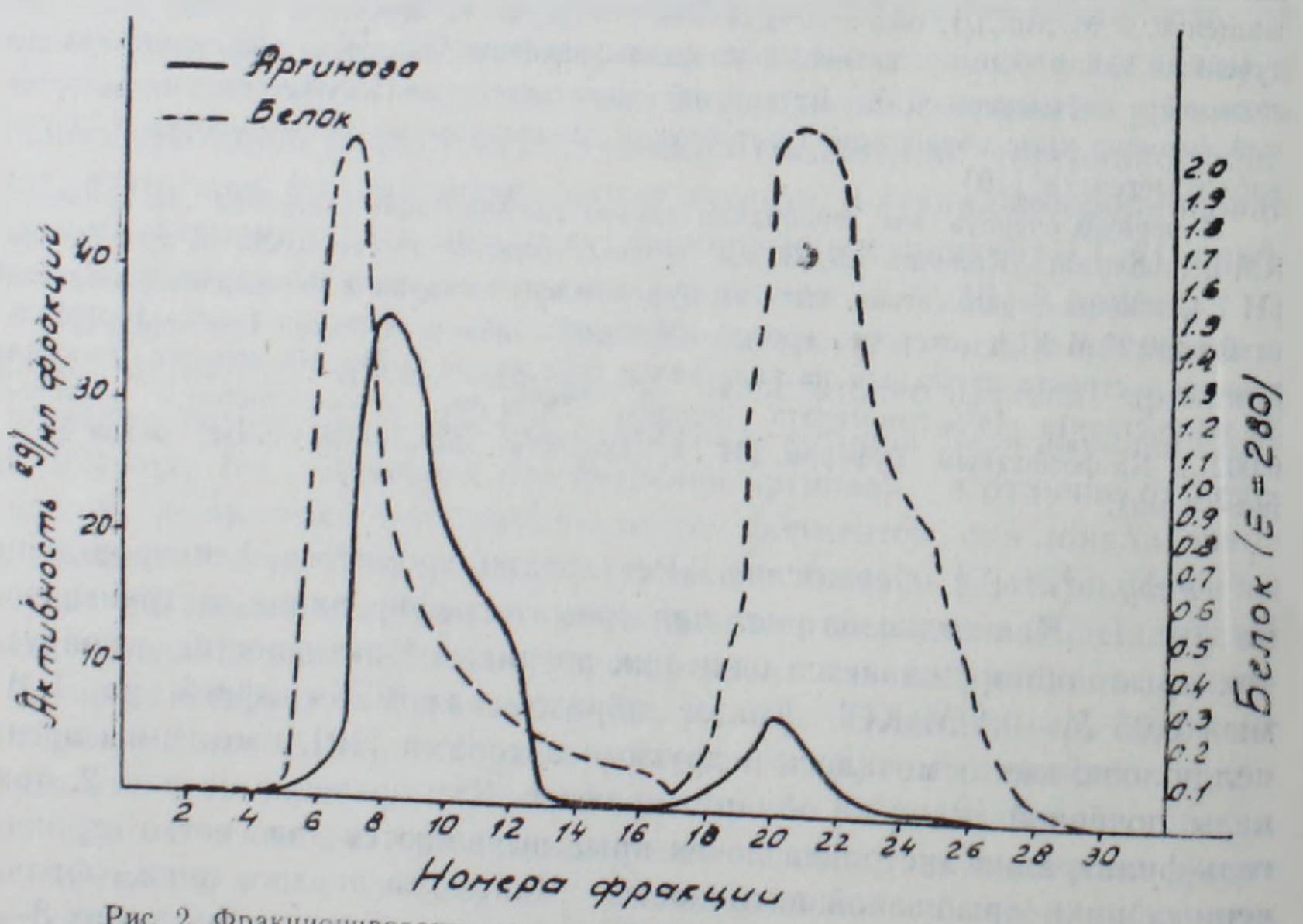


Рис. 2. Фракционирование аргиназы экстракта почек крыс на колонке с сефадексом-75.

Полученные данные позволяют заключить, что в почках крыс обнаружены два изофермента аргиназы, различающиеся по молекулярному весу.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии и проблемная лаборатория  
сравнительной и эволюционной биохимии.

Поступило 14.VII 1975 г.

Գ. Ա. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄԱՅԻՆ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ  
ՍՊԵԿՏՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Առնետների երիկամային արգինազայի իզոֆերմենտային սպեկտրի հետազոտման նպատակով մշակվել է եղանակ երիկամի կառուցվածքային տարրերի հետ կապված՝ ֆերմենտին լուծելի վիճակ փոխարկելու համար: Ցույց է տրված, որ 0,005M մալեինատային բուֆերի (pH 7,0) պատրաստված հոմոգենատը ջերմային մշակման ենթարկելիս (55°C 10 րոպե) հոմոգենատի արգինազային ակտիվության 70% անցնում է լուծելի վիճակի:

Այսպիսի ճանապարհով ստացված երիկամային մզվածքը հել-ֆիլտրացիայի ենթարկելիս (սեֆադեքս G-75) ի հայտ են գալիս արգինազային ակտիվության երկու արտահայտված գագաթներ: Հայտնաբերվել են նաև առնետների երիկամների երկու իզոֆերմենտներ, որոնք միմյանցից տարբերվում են մոլեկուլյար կշիռներով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутюнян Т. Г., Агаджанян А. Х., Ананян Л. Г., Семерджян Г. А., Геворкян А. С., Заробян Т. Я., Хачатрян М. А. Тез. докл. третьего Всесоюзн. биохим. съезда, Рига, 1974.
2. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 3, 273, 1967.
3. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 4, 237, 1968.
4. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х. Биохимия, 35, 412, 1970.
5. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х., Геворкян Д. М., Петросян Л. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 6, 15, 1970.
6. Давтян М. А., Петросян Л. А. Биологический журнал Армении, 23, 6, 1970.
7. Саруханян Ж. Г., Петросян Л. А., Баблоян Р. С., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 26, 2, 1973.
8. Hunter A. and Danphinee J. Proc. Roy Soc., B 97, 227, 1924.
9. Jip M. C. M., Knox W. E., Biochem. J., 127, 843, 1972.
10. Kaysen G. A. and Strecker H. G. Biochem. J., 133, 779, 1973.
11. Kochakian C. D. J. Biol Chem., 155, 579, 1944.
12. Mora J., Tarrab R., Martuscelli J. and Soberon G. Biochem. J., 96, 588, 1965.
13. Moore R. B., Kauffman N. J. Anal. Biochem 33, 263, 1970.
14. Porembska L. Enzymes, 15, 198, 1973.
15. Ratner S. and Petrack B. J. Biol. Chem., 200, 175, 1953.
16. Reddy S. R., Champbell J. W. Biochem. J., 115, 495, 1969.