ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

т. XXIX, № 8, 1976

УДК 577.155.91.436

Г. А. АСЛАНЯН, М. А. ДАВТЯН

ИЗУЧЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПОЧЕК КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ГИДРОКОРТИЗОНА

При введении гидрокортизона активируется аргиназа почек крыс главным образом за счет увеличения изофермента растворимой фракции клеток. Обнаруживаемые при гель-фильтрации экстракта почек крыс два изофермента аргиназы значительно различаются по ряду кинетических свойств (K_m, K_i).

Предыдущими нашими исследованиями было показано, что аргиназная активность почечной ткани крыс представлена двумя пиками, обнаруженными при гель-фильтрации. Было установлено также, что при введении гидрокортизона индуцируется только первый пик, фильтрующийся с высокомолекулярными белками. С целью выяснения вопроса о возможном внутриклеточном перераспределении аргиназной активности при введении гидрокортизона нами изучалось изменение внутриклеточной локализации аргиназы до и после введения гидрокортизона. Исследовались также кинетические свойства (K_m, K_i) изоферментов аргиназы.

Материал и методика. Опыты проводились на белых крысах весом 150—200 г. У декапитированных животных быстро извлекались почки. Для получения экстракта почек готовился гомогенат на малеинатном буфере 0,005 М, pH 7,0 (5,8 г малеиновой кислоты и 11,84 г KCl в 1000 мл воды, содержащей 0,03 М $MnCl_2$). Гомогенат подвергался тепловой обработке в течение 10 мин при 55°С, в результате чего 70% общей активности переходит в супернатант, который и подвергался фракционированию на колонке с сефадексом G-75 (колонка 2×50 см, уравновешение и элюция—0,0002 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0, скорость элюции—48 мл/час, объем фракции—4 мл). Опыты ставились как на интактных крысах, так и на животных, которым предварительно вводился гидрокортизон (внутримышечно в дозе 30 мг на 1 кг живого веса животного, 4 раза через каждые 24 часа, крыс декапитировали через час после последней инъекции).

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 (pH 9,5), предынкубировали 5 мин в атмосфере воздуха 37°С, добавляли 150 мкМ L-аргинина (0,4 мл глицинового буфера, pH 9,5), после 20-минутной инкубации реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 20% раствора ТХУ, затем центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли мочевину методом Арчибальда [1].

При определении K_m графическим методом по Лайнуиверу и Бэрку и K_i по методу Диксона [2] использовался 0,04 М глициновый буфер и 5 мкМ $MnCl_2$.

При определении внутриклеточного распределения фермента гомогенат готовился на воде в присутствии 0,025 М $MnCl_2$, после чего центрифугировался при 18000 об/мин в течение 30 мин; активность аргиназы определялась как в осадке, так и в надосадочной жидкости.

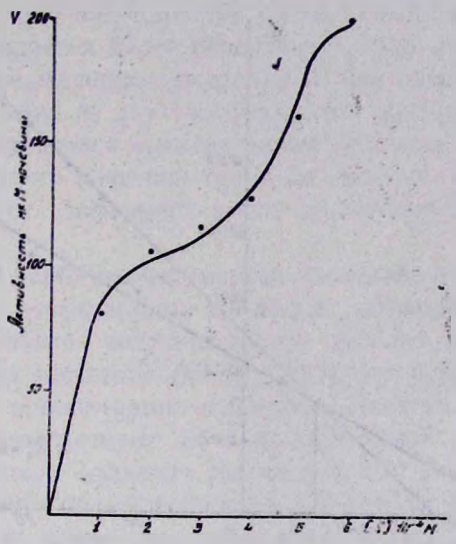

Рис. 1. Кривая зависимости активности изофермента аргиназы от концентрации субстрата.

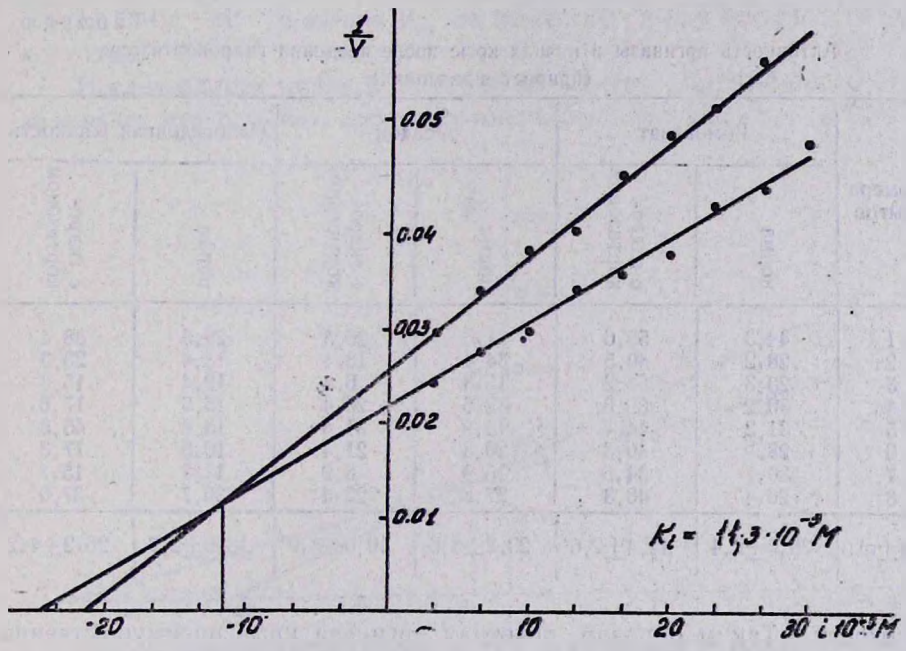

Рис. 2. Ингибирующее влияние лизина на изофермент аргиназы почечной ткани.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов исследовалось внутриклеточное перераспределение аргиназной активности в почечной ткани крыс при введении гидрокортизона (табл.).

Данные показывают, что в норме у крыс в почечной ткани 55,5% активности фермента обнаруживается в осадке гомогената, центрифугированного при 18000 об/мин в течение 30 мин, и 44,5% в надосадочной

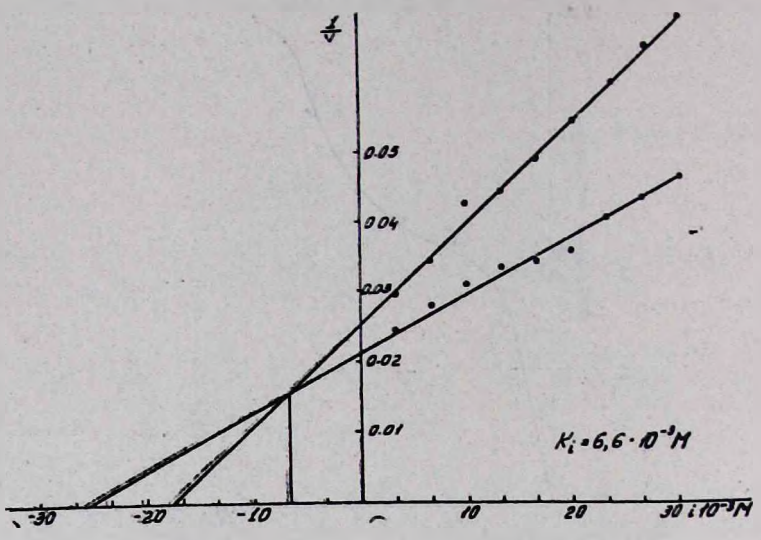

Рис. 3. Ингибирующее влияние орнитина на изофермент аргиназы почечной ткани.

Таблица

Активность аргиназы в почках крыс после введения гидрокортизона (прирост в мкмолях)

Номера опытов	Гомогенат		Осадок		Надосадочная жидкость	
	норма	с гидрокортизоном	норма	с гидрокортизоном	норма	с гидрокортизоном
1	44,3	55,6	71,6	26,5	28,5	38,4
2	28,2	40,5	34,4	18,4	13,4	23,3
3	20,3	53,2	15,8	6,4	19,4	15,3
4	30,2	39,0	32,6	20,4	16,6	17,6
5	31,2	44,4	15,9	31,8	13,8	45,3
6	28,9	40,3	20,3	21,4	10,3	17,3
7	30,7	34,6	15,9	8,9	11,3	15,7
8	26,4	48,3	27,8	23,4	30,7	37,0
M±m	30,0±2,4	44,4±2,6	29,2±6,6	19,6±3,0	18,0±2,7	26,2±4,2

жидкости. Таким образом, почечная аргиназа крыс преимущественно связана со структурными элементами клетки, что совпадает с результатами исследований и других авторов [3, 4].

После введения гидрокортизона основная активность фермента (57,6%) обнаруживается в надосадочной жидкости и значительно меньше (42,4%) в осадке гомогената. Таким образом, при введении гидрокортизона в локализации аргиназы происходят значительные сдвиги, выражающиеся в преобладании количества растворимой формы фермента. Можно предположить, что при введении гидрокортизона

аргиназа, связанная со структурными элементами, переходит в растворимое состояние, либо индуцируется растворимый фермент. Последнее предположение является более вероятным, если учесть, что, согласно данным наших предыдущих исследований, при введении гидрокортизона индуцируется один из двух изоферментов аргиназы, а именно изофермент, фильтрующийся с высокомолекулярными белками при гельфильтрации экстракта почечной ткани на колонке с сефадексом G-75. По-видимому, этот изофермент имеет цитоплазматическую локализацию.

В следующей серии экспериментов исследовались некоторые кинетические свойства изоферментов аргиназы, обнаруживаемые при гельфильтрации экстракта почечной ткани. Кривая зависимости активности изофермента аргиназы (фильтрующегося с высокомолекулярными белками) от концентрации субстрата носит сигмоидный характер (рис. 1), что свидетельствует об аллостерической природе фермента. Интересно, что после введения гидрокортизона характер зависимости активности фермента от концентрации субстрата не меняется. Соответственно фермент имеет различные значения K_m при низких и высоких концентрациях субстрата. При низких концентрациях субстрата K_m имеет значение 3×10^{-2} М, а при высоких, оно меняется и соответствует 1×10^{-1} М. Значения K_m не меняются и при введении гидрокортизона.

Исследовалось также K_i этого изофермента. Данные рис. 2—5 показывают, что орнитин, лизин, γ-аминомасляная кислота (ГАМК) и

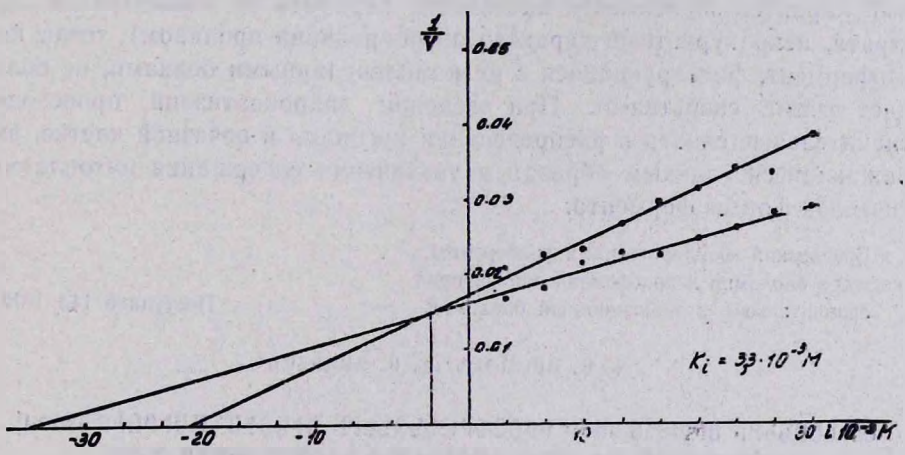

Рис. 4. Ингибирующее влияние ГАМК на изофермент аргиназы почечной ткани.

пролин являются конкурентными ингибиторами. Что же касается изофермента аргиназы почечной ткани, фильтрующейся с низкомолекулярными белками, который, как уже отмечали, при введении гидрокортизона не подвергается индукции, то активность его зависит от концентрации субстрата (по кривой Ментена-Михаэлиса) и не подвергается

ингибиции субстратами (орнитин, лизин, ГАМК, пролин). Значение K_m этого изофермента соответствует 1×10 М.

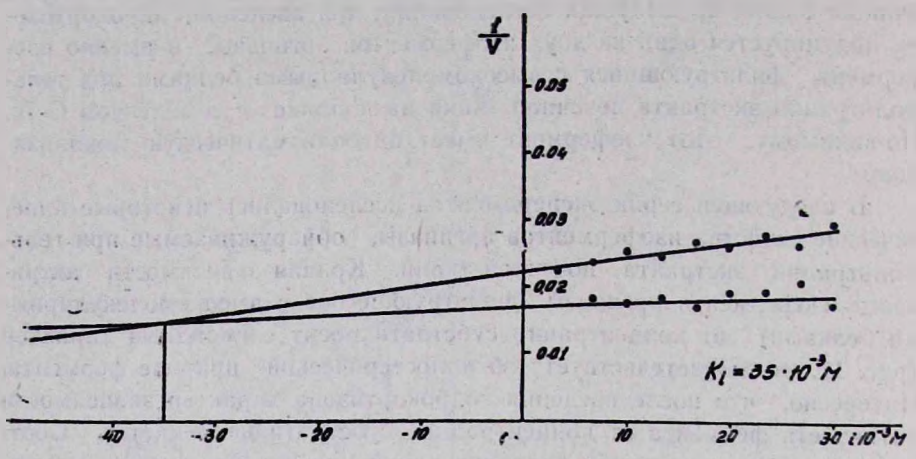

Рис. 5. Ингибирующее влияние пролина на изофермент аргиназы почечной ткани.

Таким образом, обнаруженные при гель-фильтрации экстракта почек крыс изоферменты аргиназы существенно отличаются по ряду свойств. Изофермент аргиназы, фильтрующийся с высокомолекулярными белками, подвергаясь резкой индукции при введении гидрокортизона, обладает, кроме того, аллостерическими свойствами (сигмоидный характер зависимости активности фермента от концентрации субстрата, неконкурентный характер ингибирования пролином), тогда как изофермент, фильтрующийся с низкомолекулярными белками, не обладает этими свойствами. При введении гидрокортизона происходят значительные сдвиги в распределении аргиназы в почечной клетке, выражающиеся главным образом в увеличении содержания цитоплазматической формы фермента.

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

Поступило 14.I 1976 г.

Գ. Ա. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՌՆՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ ԵՎ ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻԶՈՆԻ ՆԵՐԱՐԿՈՒՄԻՑ ՀԵՏՈ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ուսումնասիրվել է սպիտակ առնետների երիկամների էքստրակտների հելֆիլտրացիայի մեթոդով (սեֆադեքս G—75) ստացված իզոֆերմենտների մի շարք հատկություններ։ Ցույց է տրված, որ բարձրամոլեկուլյար սպիտակուցների հետ ֆիլտրվող արգինազայի իզոֆերմենտը օժտված է ալոստերիկ հատկություններով (ֆերմենտի ակտիվության վախտամը ստերատորի կոնցենտրա-

ցիայից արտահայտվող կորագծի միջանկյալ բնույթը, K_m-ի տարբեր արժեքները սուբստրատի բարձր և ցածր կոնցենտրացիայի դեպքում), մինչդեռ ցածրամոլեկուլյար սպիտակուցների հետ ֆիլտրվող իզոֆերմենտը աղքատ է կարգավորման հնարավորություններից։ Հիդրոկորտիզոնի ներարկման ազդեցությամբ տեղի են ունենում զգալի տեղաշարժեր ֆերմենտի ներբջջային տեղաբաշխման մեջ։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Moore R. B., Kauffman N. J.* Anal. Biochem. 33, 263, 1970.
2. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М., 1966.
3. *Давтян М. А., Петросян Л. А.* Биологический журнал Армении, 23, 6, 1970.
4. *Kaysen G. A.* and *Strecker H. J.* Biochem. J. 133, 779, 1973.