

Э. Х. БАРСЕГЯН, Ф. Ц. НИКОГОСЯН, М. А. ДАВТЯН

## ИЗУЧЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ *RANA RIDIBUNDA* В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА

Изучалась аргиназная активность печени лягушек *Rana ridibunda* в течение индивидуального развития. Определена внутриклеточная локализация фермента в онтогенезе. Исследовалась степень активирования аргиназы растворимой и нерастворимой фракций ионами  $Mn$ .

Исследовался изонизимный спектр аргиназы печени лягушек в онтогенезе. На ранних стадиях развития до метаморфоза обнаружены два-три пика аргиназной активности, а после метаморфоза лишь один сильно выраженный пик фермента.

Одним из интересных вопросов эволюционной биохимии является вопрос формирования уреотелического механизма нейтрализации аммиака. По мнению Коэна и Брауна, уреотелизм возник на определенном этапе эволюционного развития в результате интеграции в печени животных филогенетически очень древнего процесса биосинтеза аргинина с еще одним звеном—ферментативной реакцией расщепления его аргиназой [1].

Обширные исследования, проведенные в сравнительно-эволюционном аспекте, и анализ многочисленных литературных данных привели к заключению о широком биологическом распространении аргиназы и существовании по крайней мере 2 молекулярных форм ее. Одна—уреотелическая, присутствующая лишь в печени уреотелических животных, другая—неуреотелическая, имеющая очень большое биологическое распространение и не участвующая в механизме нейтрализации аммиака.

Неуреотелический фермент содержится и во внепеченочных органах уреотелических животных и, вероятно, в печени их, наряду с уреотелическим [2—4].

В свете этих соображений был пересмотрен вывод Коэна и Брауна о формировании уреотелизма. Очевидно, механизм формирования уреотелизма связан с интеграцией ферментов биосинтеза аргинина именно с уреотелической аргиназой (а не вообще с аргиназой), индуцированной в условиях, необходимых для функционирования уреотелического цикла [2].

Известно, что амфибии до метаморфоза являются аммонотелическими организмами, хотя в печени их содержатся все ферменты орнитинового цикла. На основании этого наблюдения Мора и сотр. [5, 6] заключили, что, по-видимому, суть механизма возникновения уреотелизма при метаморфозе заключается в глубоких изменениях внутриклеточной локализации аргиназы, приводящих к функционированию ферментов орнитинового цикла в виде единого механизма.

Другая группа авторов, основываясь на том факте, что и до метаморфоза при добавлении к гомогенатам печени мексиканского аксолотля ионов двухвалентных металлов (Mn, Co, Ni и др.) эндогенно синтезированный аргинин гидролизуется аргиназой, полагает, что, очевидно, формирование уреотелизма при метаморфозе обуславливается стабилизацией четвертичной структуры имеющейся аргиназы под влиянием ионов двухвалентных металлов [7].

На наш взгляд, более логично допущение индукции новой (уреотелической) аргиназы в печени амфибий при метаморфозе. Не исключается, что индуцированная аргиназа начинает функционировать наряду с возможно существующей неуреотелической аргиназой. Основанием для подобного заключения являются и наши предыдущие исследования, согласно которым в печени уреотелических животных (крысы) содержатся 2 генетически по-разному детерминированных изофермента аргиназы, из которых лишь один подвергается индукции при введении гидрокортизона [8].

Для внесения ясности в вопрос о возникновении уреотелизма при метаморфозе амфибий нами были предприняты настоящие исследования. Изучались изменения внутриклеточной локализации и изоферментного спектра аргиназы печени озерной лягушки *R. ridibunda* в различные периоды развития до и после метаморфоза. При этом мы исходили из многочисленных литературных данных о том, что уреотелическая аргиназа печени в основном является цитоплазматическим ферментом [9—13], а неуреотелическая связана со структурными элементами клетки [14]. Учитывая, что в большинстве случаев изоэнзимы ферментов различаются по внутриклеточной локализации, следовало ожидать изменения изоэнзимного спектра аргиназы параллельно изменению внутриклеточной локализации фермента.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили головастики и лягушки *Rana ridibunda*. Головастики выловлены в районах озера Айгер-лич и реки Мецамоп. Головастики содержались в стеклянных аквариумах при комнатной температуре. Классификацию этапов развития проводили по Терентьеву [15]. Первые 19 стадий развития—эмбриональные. 30-я стадия соответствует началу истинного метаморфоза.

Гомогенизацию печени проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема со стеклянным пестиком. В экспериментах использовали 5% гомогенат печени на воде. Центрифугирование гомогенатов проводили при 25.000 g в течение 30 мин. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [16] с изменениями путем инкубирования ферментного препарата при 37° в течение 50 мин в глициновом буфере (0,05 M pH 9,5), в присутствии L-аргинина (50 мкмоль) и  $MnCl_2$  (5 мкмоль). Количество образовавшейся мочевины определяли уреазным методом, с последующим определением аммиака микродиффузионным методом Зеллинсона [17] в модификации Силаковой и сотр. [18]. Активность фермента выражали в мкмольх мочевины на 1 г свежей ткани. Фракционирование экстрактов печени проводили методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200. На колонку (1,5×50 см) наносили 2,5—3 мл экстракта 5% гомогената. Уравновешивание и элюция—0,2 M NaK-фосфатным буфером, pH 7,4. Скорость элюции—5 мл за 30 мин. Концентрацию белка определяли по интенсивности поглощения света при 280 мкм на СФ-4А.

*Результаты и обсуждение.* В I серии экспериментов исследовалась активность аргиназы в гомогенатах печени, а также в надосадочной жидкости и осадке центрифугированного при 25.000 g гомогената на всем протяжении развития лягушек: до метаморфоза, после метаморфоза и у зрелых форм. Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Активность аргиназы печени лягушки *R. ridibunda*  
в онтогенезе, мкмоль/г**

Стадия развития	Активность в гомогенате	Активность в надосадочной жидкости	Активность в осадке
21—24	1117,7±53,8 (8)	820,7±59,9 (8)	213,7±20,2 (8)
25—26	3580±256,6 (10)	2804±175,9 (10)	804,2±87,1 (10)
27—28	6674,2±255 (7)	5040±352,4 (7)	1030±139,7 (7)
29—30	9996,6±387,9 (6)	6940±484,4 (6)	3163±296,7 (6)
31 (сеголетка)	13546,6±279,9 (6)	11813,3±357,3 (6)	1235,6±226,7 (6)
Взрослая лягушка	23508±1162,8 (7)	20257,1±1391,5 (7)	921,4±87 (7)

Данные таблицы показывают, что активность фермента возрастает по мере развития организма, особенно начиная с 27—28-й стадий развития (рис. 1). Если в течение первых 26-ти стадий развития активность аргиназы в гомогенатах печени достигла 3580 мкмоль на 1 г свежей ткани, то за оставшиеся последние 4 стадии, включая стадию «истинного метаморфоза», она заметно возросла и достигла у метаморфизированных лягушек (сеголеток) 13546 мкмоль.

Полученные данные согласуются с литературными, по которым темпы активирования аргиназы печени у головастиков *R. catesbeiana*, *R. hecksheri* и *Bufo terrestris* [19, 20] заметно ускоряются в последние дни развития при естественном метаморфозе, а также при искусственном метаморфозе, вызванном введением тироксина [20].

Интересно, что активность аргиназы в печени зрелых лягушек в 2 раза выше, чем в печени сеголеток, что также соответствует литературным данным [21]. Таким образом, в течение метаморфоза заметно повышается активность аргиназы, наряду с активностью, как отмечалось другими исследователями [21], остальных ферментов орнитинового цикла.

Данные табл. 1 показывают, что в течение онтогенетического развития подвергается значительным изменениям и распределение активности аргиназы в растворимой и нерастворимой (осадок) фракциях клетки.

Изменение активности аргиназы растворимой фракции при развитии лягушки подчиняется тем же закономерностям, что и в гомогенате, т. е. значительно активизируется при метаморфозе. В нерастворимой

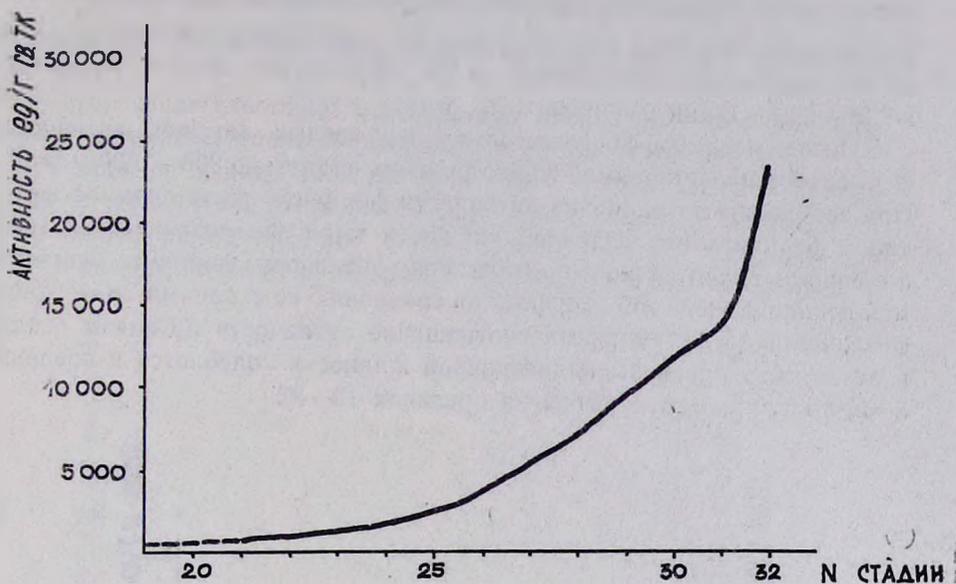
Рис. 1. Активность аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* в онтогенезе.Влияние ионов Мп на активность аргиназы  
печени лягушек, мкмоль/г

Таблица 2

Стадии развития	С ионом Мп			Без иона Мп		
	активность в гомогенате	активность в надосадочной жидкости	активность в осадке	активность в гомогенате	активность в надосадочной жидкости	активность в осадке
21—24	880	580	110	540	250	30
	1016	944	182	560	440	60
	1200	840	240	600	380	52
	1256	832	186	620	432	40
25—26	2900	2500	816	1690	1300	290
	3100	2400	800	1720	1220	380
	3600	3150	1220	1600	1350	400
	3740	2560	472	1320	900	66
	4880	2860	480	2040	1240	150
27—28	6920	5511	900	3160	2300	250
29—30	8800	5120	2340	3460	2440	700
	9680	7200	3400	4620	3840	640
После метаморфоза	13120	12560	1690	11360	10320	240
	14560	10960	2020	10960	7840	290
	17920	17280	1100	13280	12000	160
	23520	20800	1080	18400	14080	200
	22720	20480	950	16960	15840	220

фракции до окончания метаморфоза этот показатель, постепенно повышаясь, достигает 3163 мкмоль на 29—30-й стадии против 213 мкмоль на 21—24-й стадии развития.

После метаморфоза у сеголеток и у зрелых лягушек активность фермента в нерастворимой фракции вновь падает до 900—1200 мкмоль. При сравнении соотношения активности фермента нерастворимой фракции и фермента надосадочной жидкости вырисовывается четкая закономерность значительного преобладания активности фермента растворимой фракции после метаморфоза по сравнению со стадиями до метаморфоза. Если до метаморфоза соотношение активности аргиназы осадка и активности аргиназы надосадочной жидкости колеблется в пределах 3—5, то после метаморфоза—в пределах 10—22.

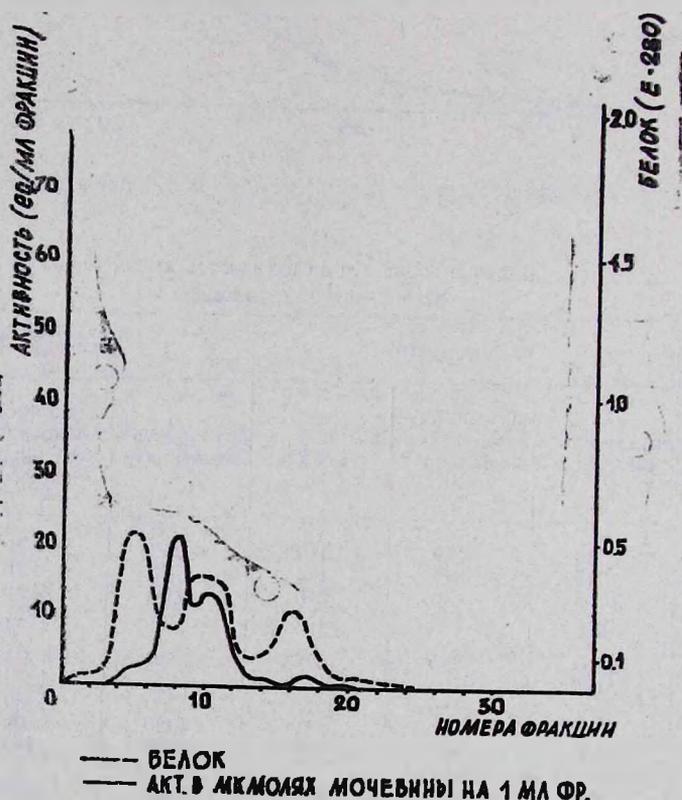


Рис. 2. Фракционирование экстракта печени головастика (стадии 23—27).

Таким образом, можно заключить, что в процессе онтогенетического развития лягушек активность нерастворимых и растворимых изоферментов подвергается значительным изменениям, причем наблюдаемое при метаморфозе активирование аргиназы происходит преимущественно за счет растворимых ферментов. Очевидно, наблюдаемая картина может явиться следствием не только количественных, но и качествен-

ных изменений в изоферментном спектре аргиназы печени лягушек при онтогенезе.

Об этом свидетельствуют и результаты проводимых нами исследований по изучению степени активирования аргиназы ионами  $Mn$ .

Как видно из данных табл. 2, ионы  $Mn$  в концентрации 5 мкмоль активируют аргиназу нерастворимой фракции значительно больше, чем аргиназу растворимой фракции. Если фермент в осадке активируется от 4 до 8 раз, то фермент растворимой фракции не более чем 2 раза.

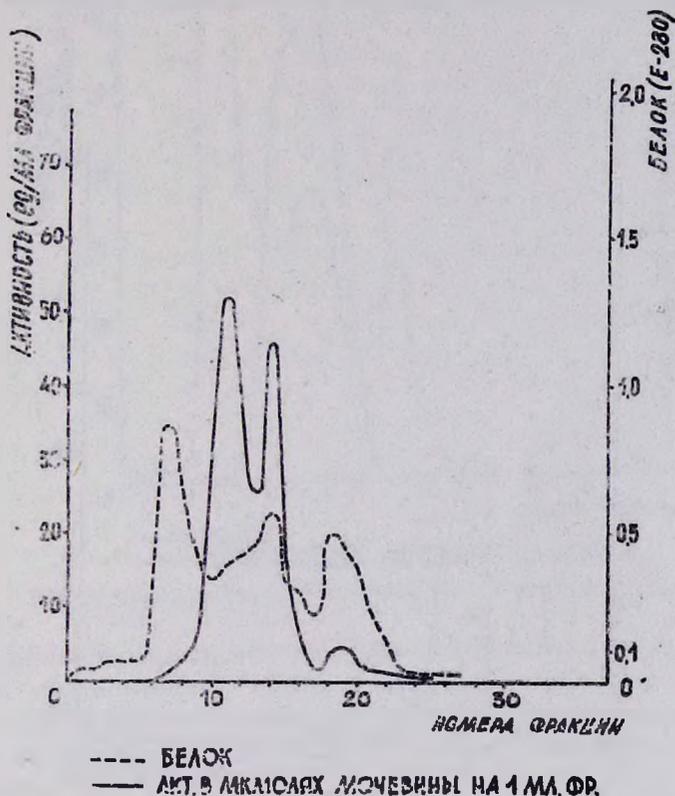
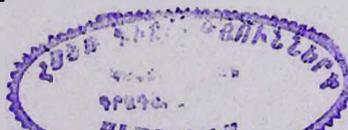


Рис. 3. Фракционирование экстракта печени головастиков (стадии 25—28).

Интересно, что степень активирования ионами  $Mn$  как растворимой, так и нерастворимой фракции меняется в течение онтогенетического развития. До метаморфоза фермент осадка активируется значительно слабее (не более 4 раз), чем после метаморфоза (не менее 7 раз). А в растворимой фракции наблюдается обратная закономерность: до метаморфоза он активируется приблизительно в 2 раза, а после метаморфоза весьма незначительно. Учитывая тот факт, что уреотелическая аргиназа имеет преимущественно цитоплазматическую локализацию [8—13], а неуреотелическая в основном связана со структурными элементами клетки [14], можно предположить, что, по-видимому, при ме-



гаморфозе активируется растворимый уреотелический изоэнзим аргиназы печени, который продолжает функционировать с сохранившим активность неуреотелическим изоэнзимом нерастворимой, и, возможно, растворимой фракции.

С целью изучения предполагаемых изменений в изоэнзимном спектре аргиназы растворимой фракции в новой серии опытов растворимую фракцию гомогената печени лягушек подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G—200. Приведенные на рис. 2—5 кривые гель-фильтрации показывают, что при фракционировании растворимой фракции печени на всех стадиях развития лягушек обнаруживаются 3 белко-

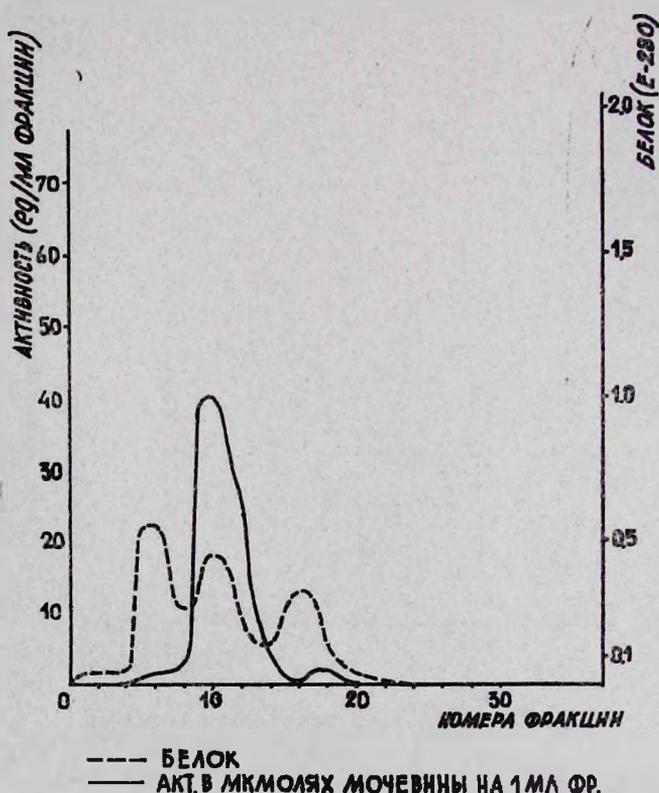


Рис. 4. Фракционирование экстракта печени головастиков (стадии 28—30).

вых пика. На ранних стадиях развития (до 28-й стадии) проявляются 3 пика аргиназной активности—первые два пика (I и II) фильтруются вместе со II белковым пиком, а III пик аргиназной активности с III белковым пиком. На 28—30-й стадиях развития выявляются 2 пика активности фермента (I и III). А после метаморфоза у сеголеток, а также у зрелых лягушек обнаруживается лишь 1 сильно выраженный пик аргиназы (I пик).

Таким образом, в процессе развития как в количественном, так и в качественном отношении изоферментный спектр аргиназы подвергается

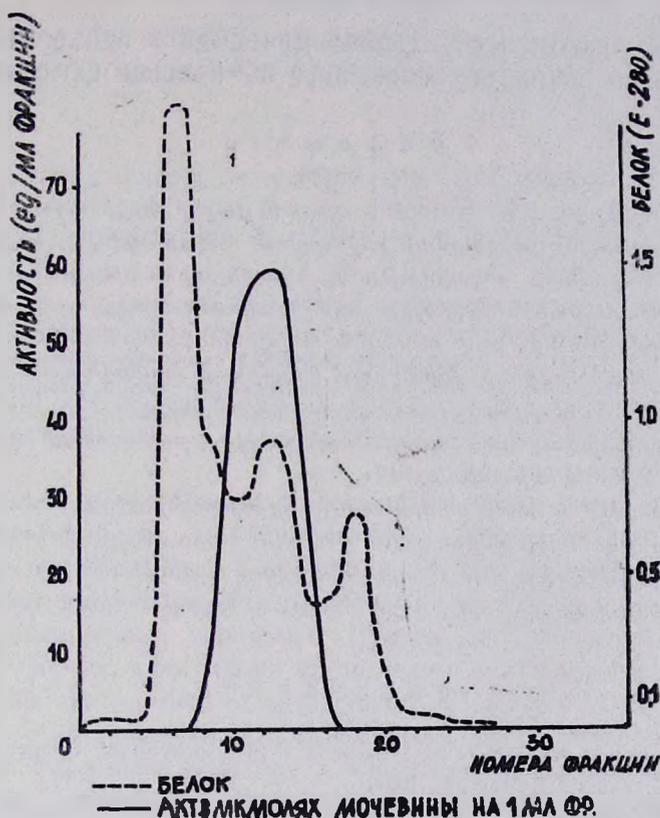


Рис. 5. Фракционирование экстракта печени лягушек *R. ridibunda*.

ется существенным изменениям. Одни изоферменты активируются (возможно, индуцируются), другие инактивируются (возможно, репрессируются). Среди указанных изменений особое внимание привлекает резкое активирование (вероятно, индукция) I изофермента при метаморфозе.

Мы склонны считать, что I пик аргиназы, обнаруживаемый после метаморфоза, либо полностью состоит из уреотелического фермента, либо содержит также неуреотелические изоэнзимы, не разделяющиеся гель-фильтрацией. Так или иначе полученные нами данные не оставляют сомнения в том, что при метаморфозе лягушек резко индуцируется один из трех обнаруживаемых гель-фильтрацией изоферментов растворимой фракции печени лягушек.

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

Поступило 24.XI 1976 г.

Է. Խ. ԲԱՐՍԵԳՅԱՆ, Յ. Ց. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

## ԳՈՐՏԻ (R. RIDIBUNDA) ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՑԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿԿՏՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՆԹՈԳԵՆԵԶԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

## Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազային ակտիվությունը անհատական զարգացման ընթացքում: Առաջուցվել է, որ օնթոգենեզի ժամանակ ֆերմենտի ակտիվությունը նկատելիորեն բարձրանում է, բացահայտվել է ֆերմենտի ներբջջային լոկալիզացիան: Պարզվել է, որ արգինազայի ակտիվությունը բջջի լուծելի և անլուծելի ֆրակցիաներում տարբեր է, ընդ որում՝ մետամորֆոզի ընթացքում ֆերմենտի ակտիվության բարձրացումը տեղի է ունենում ի հաշիվ լուծելի իզոֆերմենտների: Մյուս կողմից ազդեցությամբ փոփոխվում է լուծելի և անլուծելի ֆրակցիաների ակտիվացման աստիճանը օնթոգենեզի ընթացքում:

Հետազոտվել է նաև արգինազայի իզոֆերմենտային սպեկտրի փոփոխությունը օնթոգենեզի ընթացքում: Պարզվել է, որ մինչև անհատական զարգացման մետամորֆոզի էտապը նկատվում է արգինազային ակտիվության 2—3 մաքսիմում (ՊԻԿ), որից հետո հայտնաբերվում է միայն մեկը:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cohen P. P. and Brown G. W. Abstracts V-th International Congress of Biochemistry, Symp. III, Moscow, 1961.
2. Դավթյան Մ. Ա., Բունյաթյան Գ. Խ., Գեորգյան Ժ. Մ. և Սեդրաքյան Լ. Ա. Вопросы биохимии мозга, 6, 15—22, Ереван, 1970.
3. Buniatian H. Ch. and Davtian M. A. J. Neurochem., 13, 743, 1966.
4. Դավթյան Մ. Ա. Биохимия, 35, 412, 1970.
5. Mora J., Tarrab R., Vojalil L. F. Biochim. Biophys. Acta, 118, 206—209, 1966.
6. Mora J., Martuscellil J., Ortiz-Plineda J. and Soberon G. Biochem. J., 96, 28—35, 1965.
7. Palacios R., Hultron C. and Soberon G. Biochem. J., 114, 449—454, 1969.
8. Դավթյան Մ. Ա., Սեդրաքյան Լ. Ա. Биологический журнал Армении, 23, 6, 99, 1970.
9. Behrens M. Z. Physiol. Chem., 158, 27, 1939.
10. Rosenthal O. Federat. Proc., 12, 260, 1953.
11. Rosenthal O., Gottlieb B., Gorry J. Federat. Proc., 13, 284, 1954.
12. Schimke R. T. J. Biol. Chem., 237, 459, 1962.
13. Ковальский В. В., Дубинская Н. И., Исаченков В. И. ДАН СССР, 182, 1435—1438, 1968.
14. Դավթյան Մ. Ա. Вопросы биохимии мозга, IV, 237—265, 1968.
15. Теретьев П. В. Лягушка, М., 1950.
16. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183, 1949.
17. Selingson D. and Selingson M. J. Lab. and Clin. Med., 38, 324, 1951.
18. Տիգրանյան Ա. Ի., Գրիգորյան Կ. Ն., Կարամյան Ա. Վ. Вопр. мед. химии, 8, 588, 1962.
19. Munro A. Biochem J., 33, 1957, 1939.
20. Dolphnt J. L. and Frieden E. J. Biol. Chem., 217, 735, 1955.
21. Brown G. W., Brown W. R. and Cohen P. P. J. Biol. Chem., 234, 7, 1775—1780, 1959.