ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXII, 8, 1979

УДК 612.58

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МАРГАНЦА НА АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ МОЗГА В ХОДЕ АККЛИМАЦИИ КРЫС К ХОЛОДУ

Л. С. АРУТЮНЯН

Исследовалось влияние ионов марганца на активность аргиназы мозга акклимируемых к холоду крыс при pH 9,5 и 7,5 и температуре инкубации 37° и 15°. Полученные результаты указывают на то, что чувствительность фермента к активатору в процессе адаптации к холоду в неоптимальных условиях инкубации возрастает.

При акклимации крыс к низкой температуре окружающей среды происходит резкое снижение активности аргиназы мозга [8]. Причины изменения активности фермента при адаптации к холоду неизвестны. Косвенным доказательством того, что в условиях адаптации к холоду изменяются свойства аргиназы мозга, является обнаруженное нами ранее изменение чувствительности фермента к температуре инкубации и pH среды [7]. В связи с этим значительный интерес представляет исследование при действии холода процесса регуляции фермента ионами марганца, являющимися наиболее эффективным активатором аргиназы в печени и других органах [18, 19]. Аргиназа печени является металлоферментом. Для ее функционирования необходимо присутствие ионов марганца или других двухвалентных ионов (Co^{++}; Fe^{++}, Ni^{++}) [16, 17]. Полагают, что ионы марганца играют важную роль в активировании фермента печени in vivo, так как обнаружено значительное снижение его активности у животных с недостаточностью марганца [11, 12]. Установлено, что ионы марганца имеют важное значение для поддержания тетрамерной структуры печеночного фермента [12, 13]. Рядом исследователей показано, что они активируют также аргиназу мозга [3, 9, 20], однако механизм этого явления не изучен.

Известно, что активирование аргиназы ионами металлов процесс обратимый и зависит от многих факторов: природы металла, его концентрации, времени действия, pH среды и температуры инкубации [15]. Исходя из этого, представлялось целесообразным изучить активирование под влиянием ионов марганца аргиназы мозговой ткани в ходе акклимации животных к холоду в условиях различных pH и температуры инкубации. Исследовали активность аргиназы при pH 9,5 и 7,5, так как, по данным ряда авторов, в мозге, в отличие от печени, она имеет два оптимума pH [9, 14]. Для определения температурной чувствительности фермента, наряду с 37°, его активность определяли также при температуре 15°, являющейся нижней критической температурой, при которой продолжается деятельность мозга [2].

Материал и методика. Объектом исследования служили белые крысы-самцы массой 120—150 г. Животных помещали в холодовую камеру при температуре 2—4°, во время пребывания на холоде ректальная температура у них не изменялась. Контролем служили крысы, содержащиеся в условиях вивария при температуре 20—22°. Активность аргиназы определяли на 3-и, 15-е, 30-е, 45-е сутки пребывания животных на холоде. Об активности фермента судили по количеству образовавшейся мочевины, которую определяли уреазным методом. Аммиак определяли фенолгипохлоритным методом [10] после микродиффузии в течение 20 час. при комнатной температуре [21]. При определении активности аргиназы пробы, содержащие 50 мг ткани мозга в 0,5 мл, предынкубировали в течение 15 мин при 37° или 15° с 5 мкмоль $MnCl_2$, затем добавляли 20 мкмоль L-аргинина HCl и инкубировали еще 30 мин при той же температуре. В качестве буферов использовали 1/15 М калий-фосфатный буфер, pH 7,5, и 0,05 М глициновый буфер, pH 9,5. Активность аргиназы выражали в мкмоль мочевины/г ткани/30 мин.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные об изменении активности аргиназы мозга при акклимации крыс к холоду, измеренной в оптимальных условиях (pH 9,5, температура инкубации 37°).

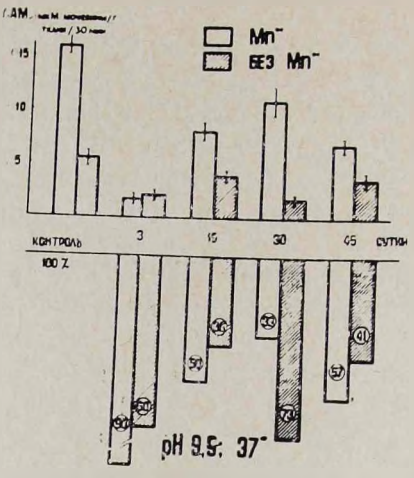

Рис. 1. Влияние ионов марганца на активность аргиназы мозга в ходе акклимации крыс к холоду

Характерно, что способность фермента активироваться ионами марганца снижается почти на всех этапах акклимации. Особенно четко это выражено на 3-и сутки пребывания крыс в холодовой камере, когда активность аргиназы в присутствии ионов марганца снижается на 90%, а без них на 68% по сравнению с контролем. В абсолютных величинах активность фермента в этих условиях примерно одинакова (таблица). Таким образом, на 3-и сутки, когда холод оказывает наиболее выраженное стрессорное действие [5], аргиназа мозга теряет способность активироваться ионами марганца, что, вероятно, связано с глубокой перестройкой в ее структуре. В ходе дальнейшей акклимации к холоду явления стресса постепенно сменяются адаптивными изменениями. На 15-е сутки активность фермента повышается по сравнению с 3-мя сутками, но она ниже на 50% в присутствии ионов марганца и на 36% в отсутствие активатора по сравнению с контролем. На 30-е сутки активирующее влияние марганца наиболее выражено, однако и в этом случае активность аргиназы ниже, чем в контроле на 33% при наличии ионов мар-

Таблица

Действие ионов Mn на активность аргиназы мозга крыс (мкМ мочевины/г ткани 30 мин) в зависимости от pH среды и температуры инкубации в ходе акклимации к холоду (n=10)

Температура инкубации		37°					15°				
Величина pH среды	Наличие активатора	Продолжительность акклимации, сутки									
		контроль	3	15	30	45	контроль	3	15	30	45
9,5	Mn^{++}	16,24±0,39	1,55±0,17	8,25±0,36	10,95±0,63	7,03±0,23	5,07±0,20	0,82±0,08	2,40±0,11	4,25±0,31	3,88±0,14
			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	без Mn^{++}	5,77±0,51	1,78±0,12	3,59±0,18	1,46±0,10	3,27±0,13	3,16±0,36	1,86±0,28	2,25±0,17	2,18±0,11	1,80±0,23
			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,002	<0,002	<0,001
f_a		2,9	0,9	2,3	7,5	2,2	1,61	0,44	1,1	2,0	2,2
7,5	Mn^{++}	9,16±0,50	1,35±0,22	3,18±0,33	7,60±0,38	7,01±0,36	3,99±0,08	1,63±0,07	1,43±0,08	4,44±0,18	3,63±0,34
			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	>0,020	>0,1
	без Mn^{++}	4,24±0,24	1,16±0,14	1,65±0,20	2,78±0,13	1,59±0,23	2,89±0,22	0,44±0,01	0,95±0,10	1,44±0,09	1,05±0,11
			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
f_a		2,2	1,2	1,9	2,7	4,4	1,4	3,7	1,5	3,1	3,4

ганца и на 73% в его отсутствие. К 45-м суткам холодового воздействия активирующее действие марганца проявляется в меньшей степени, чем на 30-е сутки, а активность аргиназы снижается по сравнению с контролем на 57 и 41% соответственно в присутствии и в отсутствие активатора. Примечательно, что во все сроки акклимации изучаемый показатель снижается более заметно при наличии ионов марганца в среде. Это свидетельствует о том, что в отсутствие активатора фермент оказывается более устойчивым к действию холода.

Вычислив отношение активностей аргиназы мозга в присутствии и в отсутствие ионов марганца, мы получили фактор активирования (f_a) и проследили за его изменением в процессе акклимации к холоду в условиях различных pH и температуры инкубации.

Как видно из данных, представленных в таблице, на 3-и сутки пребывания животных на холоде ионы марганца при температуре инкубации 37 ° не оказывают активирующего влияния на аргиназу мозга (pH 9,5), но несколько активируют ее при pH 7,5. На 15-е сутки фермент больше активируется при pH 9,5 (f_a =2,3), чем при pH 7,5 (f_a=1,9). Четко выражена зависимость степени активирования фермента от величины pH среды на 30-е сутки жизни животных в холодовой камере, когда для аргиназы мозга при pH 9,5 f_a =7,5, а при pH 7,5 f_a=2,7, т. е. фермент в это время становится более чувствительным к изменению pH среды, чем в контроле, и проявляет максимальную способность к взаимодействию с активатором при оптимальной величине pH. К моменту адаптации (45-е сутки) способность аргиназы мозга активироваться ионами марганца снижается при pH 9,5 (f_a =2,2) и возрастает в 2 раза при pH 7,5 по сравнению с контролем.

Полученные данные согласуются с результатами исследований Бендецкого, который показал, что при слабощелочном pH активирование аргиназы ионами марганца проявляется более наглядно, чем при pH 7,4 [1]. Это можно объяснить тем, что нейтральная и слабощелочная аргиназы менее прочно связаны с ионами марганца, чем основные, ввиду более легкой диссоциации марганца из комплекса Мп···—фермент, что подтверждается данными об изоэлектрическом фокусировании препарата фермента печени [18, 19].

Следующая серия экспериментов преследовала цель выяснить, как влияет снижение температуры инкубации фермента при pH 9,5 и 7,5 на процесс активирования аргиназы мозга ионами марганца в ходе акклимации животных к холоду.

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице, снижение температуры инкубации до 15° подавляет активность аргиназы при pH 9,5 у контрольных животных и во все сроки акклимации как при наличии активатора, так и в его отсутствие. На всех этапах холодового воздействия, кроме 45-х суток, отмечается снижение способности фермента взаимодействовать с активатором, о чем легко судить по изменению величины f_a. В контроле эта величина для аргиназы мозга при 37° равна 2,8, а при 15°—1,6, т. е. у контрольных животных способность к ак-

тивированию фермента ионами марганца при 15° снижается почти в 2 раза. На 3-и сутки активность аргиназы, измеренная в отсутствие ионов марганца, более чем в 2 раза выше, чем в присутствии их, т. е. ионы марганца выступают в роли своеобразного ингибитора, и $f_a = 0{,}44$ при 15°, а при 37°—0,9. По-видимому, в этот критический для жизни животного период снижение температуры инкубации приводит к таким структурным изменениям в молекуле фермента, что оптимальными для него становятся условия без ионов марганца. На 15-е сутки холодового воздействия при температуре инкубации 15° наличие ионов марганца не оказывает влияния на активность фермента, и $f_a = 1{,}1$, тогда как при 37° его способность активироваться несколько возрастает по сравнению с контролем и $f_a = 2{,}3$. На 30-е сутки способность аргиназы мозга к активированию ионами марганца при 15° возрастает значительно меньше, чем при 37°, и f_a оказывается соответственно равным 2,0 и 7,5. На 45-е сутки акклимации к холоду обнаружена одинаковая зависимость активирования ионами марганца аргиназы мозга при 37° и 15°, в обоих случаях $f_a = 2{,}2$.

Из данных, приведенных в таблице, явствует, что при снижении величины pH до 7,5 при температуре инкубации 15°, так же как и при pH 9,5, наблюдается уменьшение активности аргиназы мозга у контрольных животных как при наличии, так и в отсутствие ионов марганца по сравнению с инкубацией при 37°. Однако в ходе акклимации к холоду

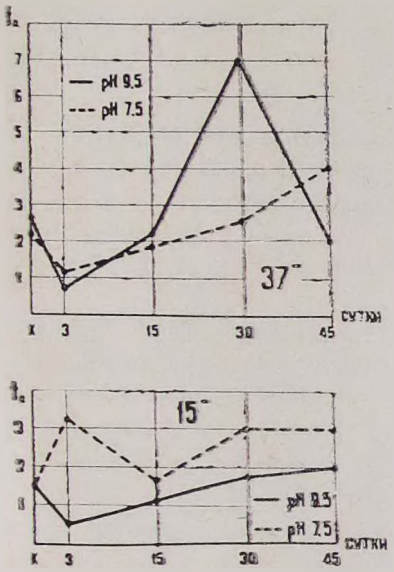

Рис. 2. Динамика активирования аргиназы мозга ионами марганца при pH 9,5 и pH 7,5 и температуре инкубации 37° и 15° в ходе акклимации крыс к холоду.

при этом отмечается иная по сравнению с pH 9,5 зависимость активирования фермента ионами марганца: снижение температуры инкубации не приводит к уменьшению активирующего влияния ионов марганца, напротив, в отдельные сроки оно даже резко возрастает, что особенно выражено на 3-и сутки, когда $f_a = 3{,}7$ по сравнению с $f_a = 1{,}2$ при 37°. Примечательно также, что на всех этапах акклимации к холоду фер-

мент проявляет более высокую чувствительность к действию активатора при pH 7,5, чем при pH 9,5, что наглядно видно из данных, представленных на рис. 2. При температуре инкубации 37° зависимость активирования аргиназы мозга ионами марганца от величины pH носит фазный характер: в основном величины I_a при pH 9,5 выше, чем при pH 7,5, тогда как у адаптированных к холоду животных (45 суток) выявляется противоположная зависимость (рис. 2).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что эффективность работы аргиназы мозга в ходе акклимации животных к холоду в неоптимальных для нее условиях (pH 7,5, температура инкубации 15°) возрастает.

По литературным данным [6], адаптация к низкой температуре на уровне ферментов проявляется в повышении их нестабильности. Биологический смысл этого явления огромен, так как факторы среды, воздействующие на организм и опосредованно — на его ферментативные системы, быстро меняются во времени. Нестабильность является свойством, благодаря которому ферменты могут эффективно реагировать на изменение этих факторов. Не исключено, что изменение стабильности аргиназы, осуществляющееся путем ослабления ее связи с активатором (ионами марганца), является биологически целесообразным механизмом регуляции активности фермента при акклимации животных к холоду.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 27. XI. 1978 г.

ՄԱՆԳԱՆԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՒՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ՝ ՑՐՏԻ ՆԿԱՏՄԱՄԲ ՎԱՐԺԵՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Լ. Ս. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է մանգանի իոնների ազդեցությունը ցրտի նկատմամբ կլիմայավարժեցված առնետների ուղեղի արգինազայի ակտիվության վրա՝ 9,5 և 7,5 pH-ի, ինչպես նաև 37° ու 15° ինկուբացիայի պայմաններում։ Հաստատվել է, որ 37°-ի և 9,5 pH-ի դեպքում ֆերմենտի մանգանի իոնների կողմից խթանման ունակությունը նվազում է առնետների ցրտի նկատմամբ կլիմայավարժեցման պրոցեսի գրեթե բոլոր էտապներում։ pH-ի և ինկուբացիայի ջերմաստիճանի (pH 7,5, 15°) իջեցման դեպքում նկատվում է մանգանի իոնների խթանող ազդեցության ուժեղացում ցրտի նկատմամբ վարժեցված կենդանիների ուղեղի արգինազայի ակտիվության վրա։ Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ֆերմենտի զգայունությունը ակտիվատորի հանդեպ ինկուբացիայի ոչ օպտիմալ պայմաններում բարձրանում է։

THE EFFECT OF MANGANESE IONS ON RAT BRAIN ARGINASE ACTIVITY DURING ACCLIMATION TO COLD

L. S. HARUTUNIAN

The effect of manganese ions on brain arginase activity of rats being acclimated to cold has been investigated at pH 9,5 and 7,5 and incubation temperature 37° and 15°. It has been established that at 37° and pH 9,5 activating effect of manganese decreases during all the periods of rat acclimation to cold. The decrease of temperature and pH correspondingly to 15° and 7,5 has resulted in the enhancement of activating effect of manganese ions.

The data obtained have shown that sensitivity of arginase to activator increases in nonoptimal conditions of incubation.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бендецкий К. М.* Биохимия, *30*, 853, 1965.
2. *Гершенович З. С., Векслер Я. И., Атабегова Н. Г., Шугалей В. С.* Сб. Проблемы гибернации и искусственной гипотермии, 52, Л., 1966.
3. *Давтян М. А., Бунятян Г. Х.* Биохимия, *32*, 2, 412, 1970.
4. *Давтян М. А., Акопян Е. А., Карапогосян А. П., Торчян Р. О.* Биолог. ж. Армении, *27*, 2, 59, 1974.
5. *Кириллов О. И.* Клеточные механизмы стресса, 74, Владивосток, 1973.
6. *Максимов В. И.* Успехи совр. биол., *76*, 1 (4), 21, 1973.
7. *Шугалей В. С., Козина Л. С., Крячевская А. А.* Сб. Теоретические и практические проблемы действия низких температур на организм, 231, Л., 1975.
8. *Шугалей В. С., Козина Л. С.* Физиол. журн. СССР, *63*, 8, 1199, 1977.
9. *Фан Ем* Автореф. канд. дисс., Ростов-Дон, 1972.
19. *Brown R., Duda L.* Arch. Biochem. Biophys,, *66*, 301, 1957.
11. *Boyer P. D., Shaw J. H. Phillips P. H.* J. Biol. Chem., *143*, 417, 1972.
12. *Carvajal N., Martinez J., Fernan der M.* Biochem. Biophys. Acta, *481*, 177, 1977.
13. *Carvajal N., Veneras A., Gestreicher G., Plaza M.* Biochem. Biophys. Acta, *250*, 437, 1971.
14. *Gasiorowska I., Porewbska Z., Mochnacka I., Jachimowicz I.* Acta Biochim. Polon., *17*, 19, 1970.
15. *Greenberg D. M., Mohamed M. S.* Arch. Biochem., Biophys., *8*, 365, 1945.
16. *Greenberg D. M.* The Enzymes, *4*, 257, Acad. Press, N. Y., 1946.
17. *Hellerman L., Perkins M. E.* J. Biol. Chem., *112*, 175, 1935.
18. *Hirsch—Kolb J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M.* Compar. Biochem. Physiol., *37*, 345, 1970.
19. *Hirsch—Kolb J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M.* J. Biol. Chem., *246*, 2,395, 1971.
20. *Porembska Z.* Ensyme, 15, 198, 1973.
21. *Seligson D., Seligson H.* J. Lab. Clin. Med., *38*, 324, 1951.
22. *Shils M. E., Mc Collum J.* Nutr., *26*, 1, 1943.