

УДК 577.15:582.282.23.547.466

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АРГИНИН-ГЛИЦИН-АМИДИНОТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ И В ВИННЫХ ДРОЖЖАХ

Э. А. МАНТАШЯН, Г. Г. ЖАМГАРЯН, М. А. ДАВТЯН

Определена трансамидиназная активность в сравнительном аспекте: высокой активностью обладают почки, печень, а у лягушек и селезенка. Обнаружена трансамидиназная активность в винных дрожжах. В последних показано протекание реакции трансамидинирования между аргинином и глицином. При обработке дрожжевых гомогенатов с целью максимального извлечения фермента показана целесообразность экстрагирования гомогената в холодных условиях и его последующего диализа.

Ключевые слова: аргинина катаболизм, аргинин: глицин-амидинотрансфераза, винные дрожжи.

Фермент трансамидиназа (L-аргинин:глицин-амидинотрансфераза, КФ 2.1.4.1.) осуществляет перенос амидиновой группы аргинина на определенные амидиноакцепторы, каковыми, чаще всего, выступают глицин, орнитин, каналин. Наиболее изученной является реакция синтеза гликоцинамина из L-аргинина и глицина, интенсивно протекающая в почках всех исследованных видов млекопитающих, поджелудочной железе и в почках и печени птиц [11].

Для разнообразных групп микроорганизмов катаболизм аргинина представлен рядом ферментативных процессов [5, 9, 10]. Если в настоящее время убедительно продемонстрировано довольно широкое распространение аргиназного и деиминазного путей, то трансамидиназный путь использования гуанидиновой части молекулы аргинина мало описан и, по имеющимся данным, ограниченно распространен [1, 5, 6, 19].

Показано, в частности, что для *Klebsiella aerogenes* превращение аргинина в орнитин возможно только трансамидинажным путем, ибо ни аргиназа, ни аргининдеиминаза в *K. aerogenes* не обнаружены [7, 8]. В тканях гриба *Rapuz tigrinus* при высоких концентрациях ¹⁴C-аргинина утилизация последнего осуществлялась только путем трансамидинирования, аргиназный путь полностью отсутствовал, а декарбоксилазный и трансаминазный имел место лишь при низких концентрациях ¹⁴C-аргинина [13].

Streptomyces griseus, участвуя в биосинтезе молекулы стрептомицина (его стрептидиновой части), обладает трансамидиназной активностью [16], повышающейся по мере накопления антибиотика в культуральной жидкости [2—4]. Работами Уокера показано, что хотя транс-

амидиназа *S. griseus* не реагирует с глицином как почечный фермент, тем не менее механизм действия обоих ферментов одинаков, а реакция протекает между аргинином—орнитинном и канаванином—орнитинном [16].

Настоящее исследование было предпринято с целью сравнительного изучения трансамидиназной активности в почках, печени, легких, селезенке животных, моче больных пиелонефритом—объектах, на которых метод полностью отработан и является достоверным, и в дрожжевых гомогенатах *Saccharomyces vini*, где ранее этот фермент не изучался.

Материал и методика. Животные ткани. Немедленно после забоя животных (крыс, лягушек, кур) извлекались легкие, сердце, печень, селезенка, почки, переносились на холод и подвергались гомогенизации в стеклянном гомогенизаторе в течение 1,5—2 мин. Готовились 20% (для сердца, легких, печени, селезенки) и 4%-ные (для почек) гомогенаты на 0,067 М фосфатном буфере, рН 7,4. Двухсуточная культура дрожжей переносилась с агаризованной среды в синтетическую минеральную среду Ридер, обогащенную 0,5%-ным дрожжевым экстрактом. Культивирование велось в аэробных условиях на круговой качалке (150—200 об/мин) в колбах Эрленмейера при 30°. Экспоненциально выращенные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды промывали холодной водой и один раз 0,067 М фосфатным буфером (рН 7,4), далее ресуспендировали в определенном объеме того же буфера. Для получения гомогенатов после последней промывки дрожжи замораживали при -20° , пропускали через пресс и доводили полученную массу буфером до объема, соответствующего 20%-ной концентрации гомогената.

Определение ферментативной активности велось по Ван-Пилсуму [14]. Реакционная смесь содержала: 0,5 мл ферментной пробы, 0,5 мл 0,067 М фосфатного буфера, рН 7,4; по 0,5 мл 0,04 М растворов аргинина и глицина. В контрольные пробы субстраты добавляли непосредственно перед прекращением реакции. Пробы инкубировали в течение определенного промежутка времени при постоянном перемешивании в открытых сосудиках при 37°. Остановка реакции—10-минутное кипячение 0,5 мл инкубационной смеси. После остывания к пробам и контролям для удаления аргинина добавляли 0,5 мл коммерческого препарата аргиназы, содержащего 1,25 мг (или 36,25 ЕД) чистого фермента. Смесь инкубировали 90 мин при 37°. Белок осаждали добавлением равных объемов (по 1 мл) 0,3 N Ba(OH)₂ во фталатном буфере и 5%-ного ZnSO₄ и центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин. Для колориметрического определения гуанидинуксусной кислоты (ГУКА) использовали 1 мл центрифугата. Определение проводилось по методу Сакагучи в модификации Томлинсона [12]. К 1 мл испытуемой пробы прибавляли по 1 мл 5%-ного раствора мочевины и при непрерывном встряхивании добавляли 2 мл гипобромида калия. Смесь оставляли на 20 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность зеленым светофильтром (ФЭК-56ПМ). Концентрацию ГУКА находили по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартного раствора аргинина (0,01—1,0 мкмоль/мл раствора). Трансамидиназная активность выражалась в мкмоль синтезированной ГУКА на 1 г свежей ткани; на 1 мл мочи в условных единицах (1 у. ед. = 10 мкмоль ГУКА на 1 ч инкубации); на 100 мг абсолютно сухих дрожжей.

Результаты и обсуждение. Результаты определения трансамидиназной активности в органах животных и моче больных представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из полученных данных (табл. 1), из изученных нами органов фермент присутствует в больших количествах лишь в почках (у взрослых крыс активность в почках самцов выше, чем у самок). Со-

Таблица 1

Трансамидиназная активность в различных органах животных,
мкмоль ГУКА на 1 г свежей ткани

Источник гомогената	Крысы		Лягушки	Куры
	самец	самка		
Печень	1,22	0,00	4,74	2,52
Селезенка	1,62	1,46	9,59	1,68
Сердце	5,71	0,00	1,68	1,20
Легкие	6,97	5,01	5,40	1,56
Почки	31,65	26,05	31,44	12,58

Согласно литературным данным, высокая по сравнению с другими органами трансамидиназная активность обнаруживается в почках [18], поджелудочной железе животных [15] и печени птиц [17].

Таблица 2

Трансамидиназная активность в моче больных
(мкмоль ГУКА на 1 мл мочи, у. ед.)

Больной	Диагноз	Состояние больного	Трансамидиназа
М. Г.	Мочекаменная болезнь, хронический пиелонефрит. Терминальная стадия	тяжелое	8,2
П. А.	Хронический пиелонефрит с преимущественным поражением правой почки	удовлетворительное	28,1
Б. М.	Хронический пиелонефрит с преимущественным поражением правой почки	удовлетворительное	23,6
С. А.	Хронический пиелонефрит. Достаточная функция почек	удовлетворительное	6,8
К. А.	Хронический пиелонефрит. Сахарный диабет, стадия субкомпенсации	удовлетворительное	7,2

По нашим данным (табл. 2), высокий уровень трансамидиназы в моче отмечен у всех больных, страдающих нарушением функций почек. Если учесть, что в норме трансамидиназа в моче не обнаруживается [1], то такое тестирование позволяет по-новому подходить к биохимической оценке состояния больного и дальнейшим методам лечения.

На рис. 1 представлены результаты определения трансамидиназной активности в винных дрожжах.

Каждая партия дрожжей, соответствующая определенному сроку инкубирования, после количественного определения биомассы замораживалась, пропускалась через пресс, ресуспендировалась в определенном объеме того же буфера, экстрагировалась в холодных условиях в буфере в присутствии ЭДТА (5 мг/мл) в течение 2 ч, центрифугировалась при 6000 об/мин 15 мин; надосадок анализировался в течение ночи против буфера, после чего использовался для определения ферментативной активности.

Как видно из графика, максимум активности приходится на 14-й час выращивания дрожжей, после чего отмечается ее неуклонное снижение. В дальнейших экспериментах применялась 14-часовая культура

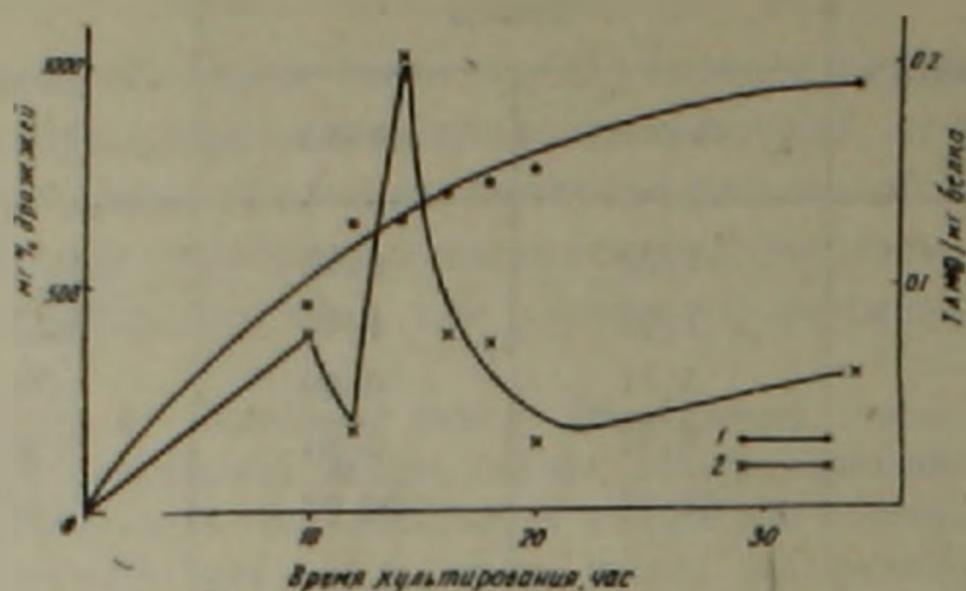


Рис. 1. 1. Биомасса дрожжей; 2. трансамидиназа/мг белка.

На рис. 2 показано влияние времени инкубации реакционной смеси на образование ГУКА. Согласно литературным данным, для выявления трансамидиназной активности используются длительные сроки инкубации—3—7 ч и более, хотя фермент в достаточной мере насыщается субстратом через час инкубации с начальным количеством аргинина и глицина по 20 мкмоль на пробу [14]. Как видно из графика, по мере увеличения времени инкубации реакционной смеси активность трансамидиназы не снижается. В дальнейших экспериментах мы остановились на 3-часовой инкубации реакционной смеси.

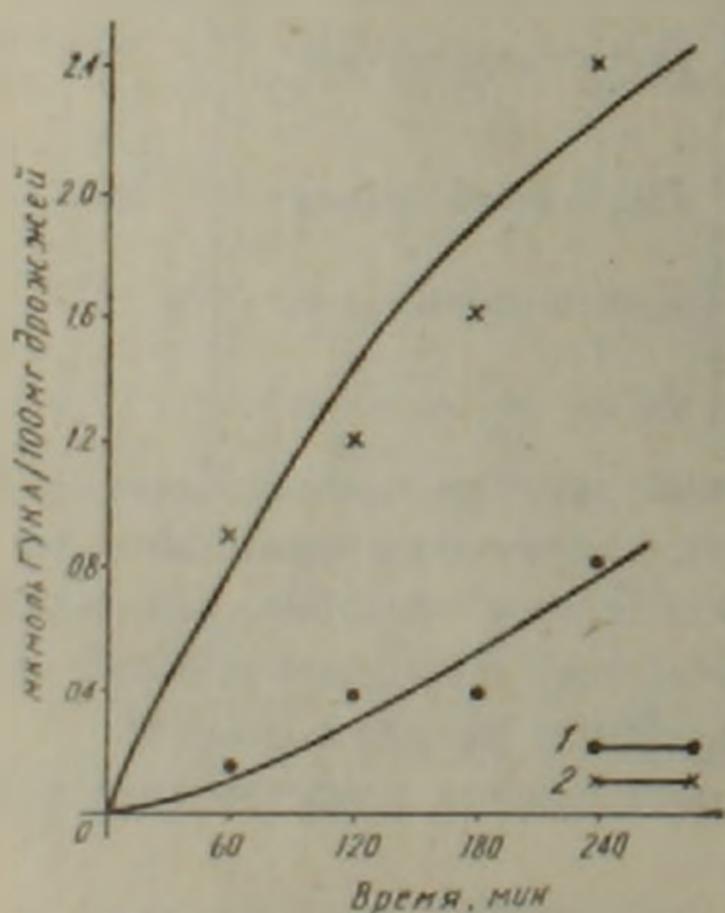


Рис. 2. 1. Целые клетки; 2. гомогенаты.

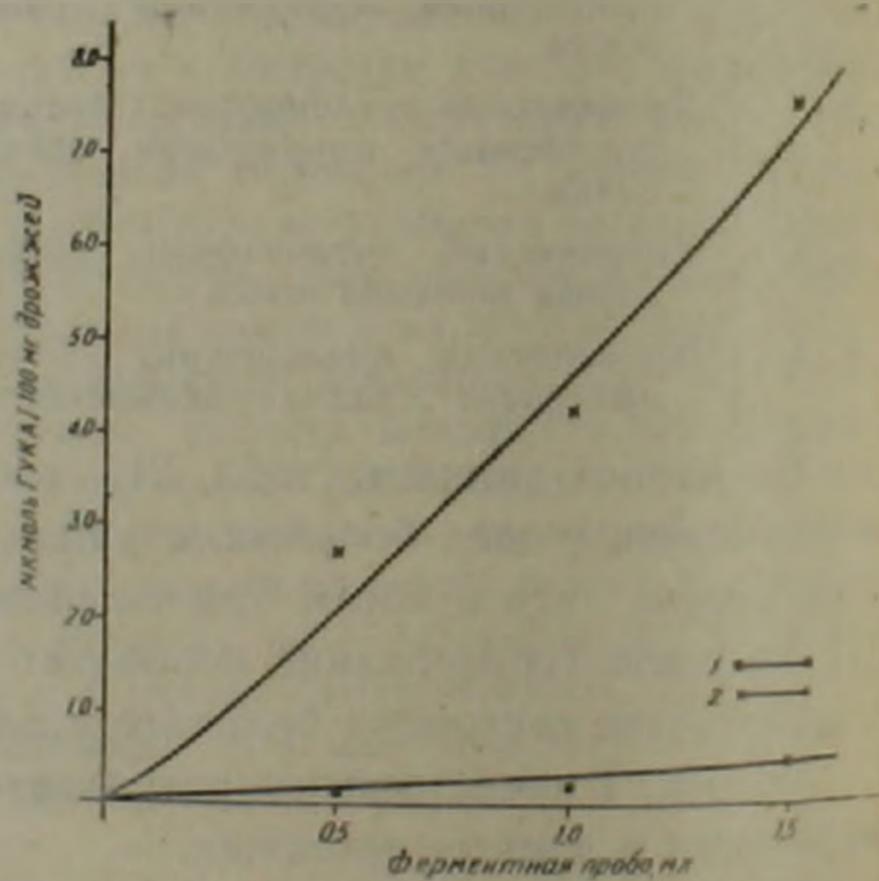


Рис. 3. 1. Целые клетки; 2. гомогенаты.

На рис. 3 показано влияние концентрации ферментной пробы на образование ГУКА. Как видим, 0,5, 1,0 и 1,5 мл 20%-ного гомогената образуют пропорционально возрастающее количество ГУКА, составля-

COMPARATIVE ACTIVITY OF L-ARGININE-GLYCINE AMIDINOTRANSFERASE IN ANIMALS TISSUES AND WINE YEASTS

E. A. MANTACHIAN, H. H. ZHAMHARIAN, M. A. DAVTIAN

Transamidinase high activity has been detected in kidney, liver and spleen. It was found also in wine yeasts biomass. Transamidination between arginine and glycine was observed after treatment of crude yeasts extracts under certain condition.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Карелин А. А. В сб. Успехи биол. химии, 15, 121—155, 1974.
2. Кузнецов В. Д., Бушueva О. А., Родионова Е. Г. Антибиотики, 20, 1, 15—18, 1975.
3. Пензикова Г. А., Левитов М. М. Микробиология, 39, 2, 337—342, 1970.
4. Пензикова Г. А., Левитов М. М., Орешина М. Г. Антибиотики, 16, 10, 900—903, 1971.
5. Abdelal Ahmed. Ann. Rev. Microbiol., 33, 139—168, 1979.
6. Bourgeois Claude. BIOS, 4, 3, 134—140, 1973.
7. Friedrich B., Magasanik B. J. Bacteriol., 133, 680—685, 1978.
8. Friedrich B., Magasanik B. J. Bacteriol., 133, 686—691, 1978.
9. Hill D. L., Van Eys J. J. Protozool., 12, 2, 259—265, 1965.
10. Mitraka Bret M., Costilow P. N. J. Bacteriol., 93, 1, 295—301, 1967.
11. Ratner S. In: The Enzymes, 6, 267, 1962.
12. Tomlinson G., Viswanatha T. Anal. Biochem., 60, 1, 15—24, 1974.
13. Uhlemann A. Biochem. a. Physiol. Pflanz., 171, 1, 33—41, 1977.
14. Van Pilsum J., Berman D., Wolln E. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 95, 1, 96—100, 1957.
15. Walker J. B. JBC, 221, 771, 1956.
16. Walker J. B. JBC, 231, 1, 1—9, 1958.
17. Walker J. B. JBC, 235, 2357, 1960.
18. Walker J. B. BBA, 73, 241, 1963.
19. Wilson O. H., Holden J. T. JBC, 244, 2737—2742, 1969.