

## НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ МОЗГА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КУР

Т. Г. АРУТЮНЯН, С. А. КАРАПЕТЯН, В. А. БАЙКОВ

Исследованы некоторые кинетические свойства ( $K_m$ ,  $K_i$ ) изоферментов аргиназы мозга в эмбриогенезе кур. Показано, что изоферменты аргиназы мозга близки по родству к L-аргинину (для I изофермента  $K_m$ —180—220, а для II—110—125 мМ), неконкурентно ингибируются L-пролином и конкурентно—ГАМК, в то время как L-орнитин и L-лизин никакого действия не оказывают.

Широкое биологическое распространение аргиназы и существование в природе нескольких ее молекулярных форм все более подтверждается многочисленными исследованиями в сравнительно-эволюционном аспекте. Обнаружена аргиназа и в мозге многих животных (крыс, кур, лягушек, водяной и наземной черепахи), обладающих разными типами экскреции азота [3], которая отличается от печеночной рядом признаков ( $K_m$ , ингибированием избытком субстрата,  $K_i$ , молекулярным весом и внутриклеточным распределением). Методом ионообменной хроматографии установлено существование двух изоэнзимов аргиназы в мозге крыс [4]. Об изоэнзимах аргиназы в мозге неуротелических животных сведений в доступной нам литературе нет.

В данной работе ставилась цель выяснить изоэнзимный спектр аргиназы в мозге кур и изучить некоторые кинетические свойства ее ( $K_m$ ,  $K_i$ ) при эмбриогенезе.

*Материал и методика.* Объектом служил куриный эмбрион породы леггорн. Мозг исследовался в разные дни (9-, 11-, 15-, 18-, 21-й) эмбриогенеза. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема с тефлоновым пестиком. Гомогенат (30%) готовили на калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Разделение белков проводили на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,02 М калий-фосфатным буфером. Объем нанесенного на колонку супернатанта и собираемых фракций составлял 4 мл. Концентрацию белка определяли по интенсивности поглощения света при 280 нм. Далее в отобранных пробах определяли аргиназную активность методом Ратнер [15] с последующим определением мочевины по Арчибальду [9]. Из кинетических свойств выявленных молекулярных форм аргиназы определены константы Михаэлиса ( $K_m$ ) на L-аргинин и константы ингибирования ( $K_i$ ). Величину  $K_m$  (инкубационная среда: глициновый буфер 0,05 М, рН 9,5;  $MnCl_2$ —5 мкмоль; объект—1 мл, L-аргинин—10—600 мкмоль, общий объем—3 мл) определяли методом Лайнуивера-Берка [6];  $K_i$ —графическим методом Диксона [6], инкубационная среда та же. L-аргинин для обоих изоферментов применяли в концентрациях 300 и 500 мкмоль. В качестве ингибиторов аргиназы применяли L-лизин, L-орнитин, L-пролин, ГАМК в количестве 1—20 мкмоль на пробу.

*Результаты и обсуждение.* При гель-фильтрации экстрактов мозга куриного эмбриона в течение развития нами получены два четко разграниченных белковых пика. Оба пика обладают аргиназной активностью, большей—первый пик, соответствующий высокомолекулярным белкам. Однако в течение развития количественное соотношение активности обнаруженных пиков значительно меняется. В первые дни эмбрионального развития происходит спад активности аргиназы I (высокомолекулярной), а начиная с 18-го дня и у вылупившихся цыплят в результате возрастания активности аргиназы II (низкомолекулярной) наблюдается их выравнивание.

Таблица

Значения  $K_m$ ,  $K_i$  изоферментов аргиназы мозга в эмбриогенезе кур

Дни развития	I пик					II пик				
	$K_m$ $10^{-2}$ М	$K_i \cdot 10^{-3}$ М				$K_m$ $10^{-2}$ М	$K_i \cdot 10^{-3}$ М			
		L-орн	L-лиз	L-про	ГАМК		L-орн	L-лиз	L-про	ГАМК
9-й	20,0	—	—	7,9	8,5	11,8	—	—	7,3	8,8
11-й	18,2	—	—	7,2	8,3	12,5	—	—	7,5	9,9
15-й	19,1	—	—	7,7	9,1	11,7	—	—	7,9	9,6
18-й	20,0	—	—	7,1	9,1	11,7	—	—	7,4	10,0
Однодневные цыплята	22,2	—	—	7,5	9,4	11,1	—	—	7,3	9,3

Итак, у цыплят первого дня развития в экстрактах мозга обнаруживаются, в отличие от печени [2], два пика аргиназы с одинаковыми активностями.

Данные таблицы показывают, что  $K_m$  для первого изоэнзима равняется 180—220, а для второго—110—125 мМ, причем по мере развития куриного эмбриона указанные значения не меняются. Таким образом, оба изоэнзима аргиназы экстрактов мозга близки по сродству к L-аргинину: несколько более выражено сродство II изоэнзима.

Определенная нами величина  $K_m$  обоих изоферментов близка к значениям  $K_m$  аргиназы печени многих урикоотелических животных—птиц, рептилий и *Neurospora crassa* [14], а также  $K_m$  второго (возможно, неуротелического) изофермента почек крыс [1]. С другой стороны, известны аргиназы неуротелического характера, как аргиназа мозга быка и крыс [5], сродство которых к субстрату очень высокое (9 и 16 мМ соответственно).

Итак, судя по значениям  $K_m$  в отношении субстрата, спектр аргиназы мозга куриного эмбриона представлен двумя изоферментами аргиназы, которые по значениям  $K_m$  близки к аргиназам печени урикоотелических организмов.

Специфическими ингибиторами аргиназ различных организмов являются лизин и орнитин. Однако имеются данные, согласно которым

ГАМК и пролин в некоторых случаях также оказывают ингибирующее влияние на аргиназу: печени, почек крысы, печени овцы, молочной железы мышей, инфузорий, тутового шелкопряда, печени куриного эмбриона [2, 7, 8, 10—13].

Из данных таблицы видно также, что на изоферменты экстрактов мозга одинаковое ингибирующее влияние оказывают L-пролин и ГАМК, в то время как L-орнитин и L-лизин никакого воздействия не оказывают. Этим изоферменты I и II мозга похожи на изофермент I печени куриного эмбриона [2].

Как показывают рис 1 и 2, изоферменты мозга по характеру ингибирования ГАМК и пролином не отличаются друг от друга. Во все сроки развития куриного эмбриона для обоих изоферментов аргиназы ГАМК является конкурентным, а L-пролин—неконкурентным ингибито-

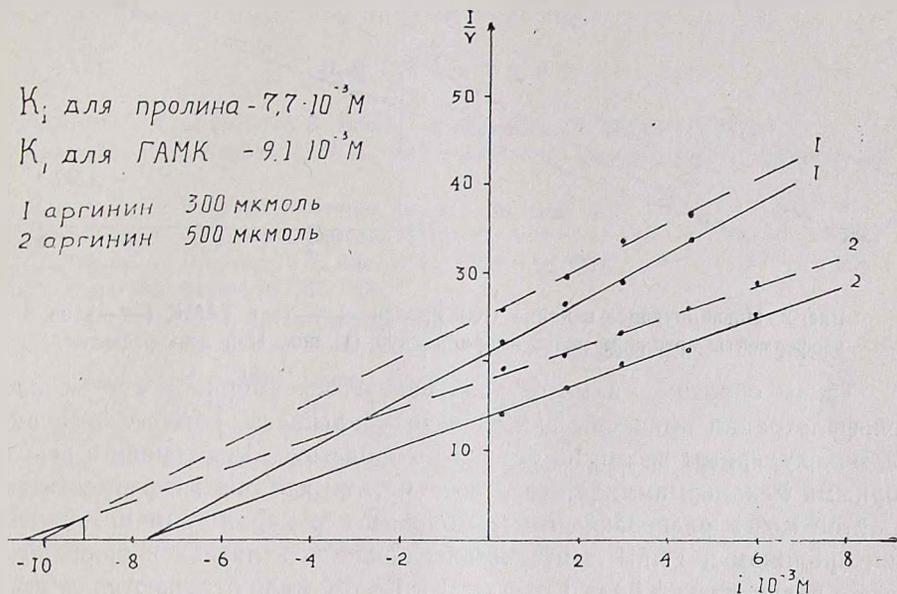


Рис. 1. Ингибирующее влияние ( $K_i$ ) пролина (—) и ГАМК (---) на изоферменты аргиназы мозга эмбриона кур (I пик, 15-й день развития).

ром. Следует отметить, что в литературе имеется достаточно данных о конкурентном ингибировании аргиназы различных организмов ГАМК, в то время как выявленный неконкурентный характер ингибирования пролином является редко встречающимся явлением. Так, L-пролином конкурентно ингибируются все изоэнзимы тутового шелкопряда, а неконкурентно—аргиназы аэробных инфузорий [7] и молочной железы мышей при низкой концентрации субстрата [12].

Полученные данные (табл.) показывают, что и по значениям  $K_i$  изученные изоэнзимы близки. Так,  $K_i$  в случае с L-пролином как для первого, так и для второго изоэнзимов имеет предел колебания  $7,1—7,9 \cdot 10^{-3} M$ , а с ГАМК— $8,3—10,0 \cdot 10^{-3} M$ . Выявленные величины  $K_i$  для ГАМК близки соответствующему показателю аргиназы печени

крыс ( $10 \cdot 10^{-3}$  М) [8], а для L-пролина—аргиназы аэробных инфузорий ( $8,6 \cdot 10^{-3}$  М) [7] и значительно ниже таковых почек крыс ( $35 \cdot 10^{-3}$  М) [1].

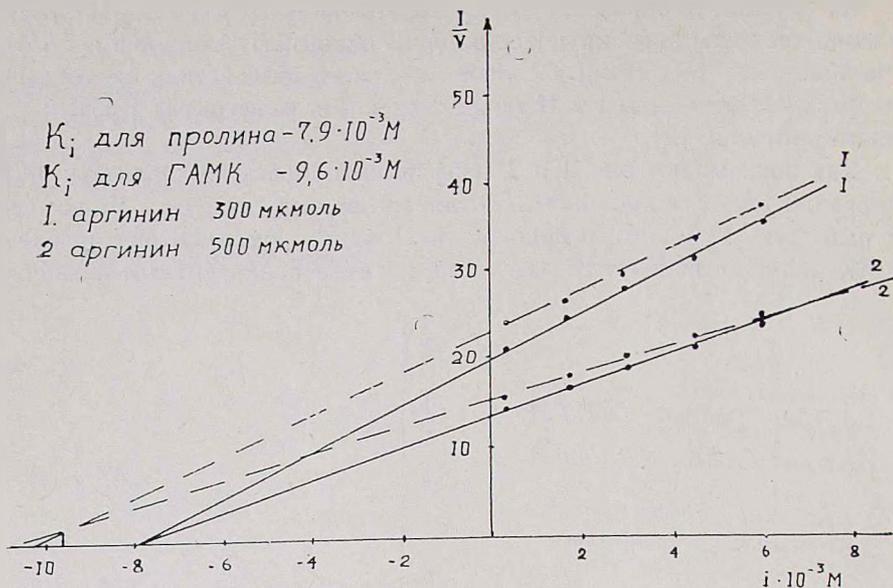


Рис. 2. Ингибирующее влияние ( $K_i$ ) пролина (—) и ГАМК (---) на изоферменты аргиназы мозга эмбриона кур (II пик, 15-й день развития).

Таким образом, в мозге развивающегося эмбриона кур методом гельфильтрации выявлены два изоэнзима аргиназы, которые отличаются молекулярным весом, но близки по сродству к L-аргину и регуляторными механизмами. Интересно отметить, что оба изофермента экстрактов мозга развивающегося эмбриона кур характером ингибирования пролином и ГАМК, нечувствительностью к лизину и орнитину, а также величинами  $K_i$  для L-пролина и ГАМК мало отличаются от высокомолекулярного изофермента печени.

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

Поступило 12.XI 1980 г.

### ՀԱՎԻ ԶԱՐԳԱՅՈՂ ՍԱՂՄԻ ՈՒՂԵՂԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Տ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ս. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Վ. Ա. ԲԱՅԿՈՎ

Ուսումնասիրվել են հավի զարգացող սաղմի ուղեղի արգինազայի իզոֆերմենտների որոշ կինետիկական հատկությունները ( $K_m, K_i$ ): Ցույց է տրված, որ ուղեղի արգինազայի իզոֆերմենտները իրենց խնամակցությամբ մոտ են L-արգինինին ( $I$  իզոֆերմենտի համար  $K_m-180-220$  մՄ, իսկ  $II-110-125$  մՄ), արգելակումը L-պրոլինով ոչ-մրցակցային բնույթի է, ԳԱԿԹ-ով

## SOME KINETIC PROPERTIES OF ISOENZYMES OF BRAIN ARGINASE IN HEN EMBRYOGENESIS

T. G. HARUTUNIAN, S. A. KARAPETIAN, V. A. BAJKOV

Some kinetic properties ( $K_m$ ,  $K_i$ ) of brain arginase isoenzymes in hen embryogenesis have been studied. It has been shown that isoenzymes of brain arginase are akin to L-arginine (for the isoenzyme  $K_m = 180-220$  mM, but for the II =  $110-120$  mM), inhibited non-competitively by L-proline and competitively by aminobutyric acid, while the effect of L-ornithine and L-lysine is absent.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асланян Г. А., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 29, 28, 8—13, 1976.
2. Арутюнян Т. Г., Карапетян С. А., Джакудзян Н. Дж. Биолог. ж. Армения, 34, 1, 1981.
3. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга, 4, Ереван, 1968.
4. Давтян М. А. Докт. дисс., Ереван, 1970.
5. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х. Биохимия, 35, 2, 412, 1970.
6. Диксон, Уэбб. Ферменты. М., 1966.
7. Заробян Т. Я. Канд. дисс., Ереван, 1978.
8. Саруханян Ж. Т., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 26, 5, 1973.
9. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.
10. Hunter H., Downs C. J. Biol. Chem., 157, 427, 1945.
11. Kaysen G. A., Strecker H. J. Biochem. J., 133, 779, 1973.
12. Kesava Rao R., Reddy S., Snam K. Int. J. Biochem., 4, 62, 1973.
13. Kesava Rao R., Pais, Joung F. J. Cancer, 30, 12, 1974.
14. Mora J., Martuscelli J., Ortiz Pineda J., Soberon G. Biochem. J., 96, 28, 1965.
15. Rather S., Pappas A. Biochem. J., 179, 1183, 1949.