

УДК 591.1.05

## ВЗАИМОСВЯЗЬ АРГИНАЗЫ И ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА КИШЕЧНИКА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

М. А. ДАВТЯН, А. Х. АГАДЖАНЯН, Х. Г. ГАСПАРЯН

Активность аргиназы и ферментов биосинтеза пролина кишечника при регенерации дождевого червя увеличивается в 1,5—2 раза. Изоэнзимный спектр аргиназы и ферментной системы биосинтеза пролина также изменяется. Активность I изоэнзима аргиназы увеличивается в 9, а второго—в 1,5 раза. По-видимому, I изоэнзим функционирует в направлении биосинтеза пролина.

*Ключевые слова:* дождевой червь, аргиназа, пролин.

Дождевой червь является уреотелическим организмом, хотя конечным продуктом азотистого метаболизма у него, помимо мочевины, является аммиак. Некоторые авторы считают, что такие организмы могут выделять также мочевую кислоту и аллантоин [4]. При анализе мочи некоторых видов дождевого червя—*Allolophora caligirosa* и *Phegipima californica* [5]—было установлено, что в 100 мл мочи содержится 2,9—4,3 мг аммиака, 31,7—39,1 мг мочевины и 2—2,2 мг протеина. При повышении температуры меняется соотношение экскретируемого аммиака и мочевины, и червь становится типичным уреотелическим организмом [11,12].

В кишечнике дождевого червя обнаружены все ферменты орнитинового цикла [5] с преобладанием аргиназы, имеющей низкий молекулярный вес (27 000.) [9]. Дождевые черви способны регенерировать при удалении передней и задней части тела, причем задняя часть восстанавливается быстрее [6]. При полном удалении нервных узлов регенерации не происходит [13]. Для быстрого протекания этого процесса необходимы аэробные условия, в анаэробных же условиях регенерация прекращается. Излишки кислорода могут блокировать ее. Скорость регенерации ослабевает также при обработке ран цианистым калием. Нормальное протекание ее наблюдается при 18—20°. Молодые особи регенерируются быстрее, чем старые [4].

Цель настоящей работы состояла в изучении взаимосвязи аргиназы и ферментов биосинтеза пролина при регенерации. Следует подчеркнуть, что вопрос о процессе биосинтеза пролина у дождевого червя совершенно не освещен в литературе.

*Материал и методика.* Объектами исследования служили дождевые черви *Lumbricus terrestris* (одинаковой массы и примерно одинакового возраста), взятые для эксперимента с территории опытного хозяйства биологического факультета ЕГУ. Кишечник червя удаляли в холодных условиях после фиксации в парафиновой ваточке, готовили 10%-ный гомогенат на смеси, состоящей из 20 мМ KCl и 80 мМ глицинового буфера (рН 9,5) в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльвевджейма. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [8] путем инкубирования

гомогената в присутствии 50 мкм L-аргинина и 5 мкм  $MnCl_2$  с последующим определением мочевины методом Арчибальда [3]. Для определения биосинтеза пролина гомогенат инкубировали при 37° в течение часа в присутствии L-орнитина (100 мкм) и  $\alpha$ -кетоглутарата (20 мкм) в виде калиевых солей в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4). После часовой инкубации с целью достижения превращения образовавшегося под влиянием орнитинтрансминазы пирролин-5-карбоксилата в пролин добавляли свежий гомогенат и НАДН, смесь инкубировали 15 мин, после чего реакцию останавливали 10-минутным кипячением. Объем инкубационной смеси для аргиназы и ферментов биосинтеза пролина составлял 3 мл. Пробы центрифугировали и в надсадке определяли пролин по ранее описанной нами методике [1].

Колориметрическое выявление синей окраски пролина проводилось в 4 мл смеси ацетон+вода с последующим определением окраски на спектрофотометре СЮ-4А при длине волны в 595 мкм.

Для наблюдений за регенерацией в каждый опыт брали 30—40 дождевых червей, которых разрезали на две равные части. Контролем служили 5 головных и 5 хвостовых частей. Черви содержались в особых сосудах, наполненных почвой, в условиях оранжереи при 23—25°. Ферментативную активность кишечника определяли в 1-й, на 2-й и 3-й дни регенерации. Для гель-фильтрации экстрактов с целью обнаружения изоферментов аргиназы и ферментов биосинтеза пролина использовали Сефадекс G-150.

*Результаты и обсуждение.* Данные о биосинтезе пролина из различных предшественников у дождевого червя представлены в табл. 1, согласно которой эффективным предшественником биосинтеза пролина, как и у изученных нами других организмов (тутовый шелкопряд, молочная железа крыс, инфузории, фасолевая зерновка), является орнитин. Биосинтез пролина из аргинина и глутамата у дождевого червя не обнаруживается, несмотря на то, что у него, по нашим данным, имеется глутамокиназная активность. Пролин синтезируется также из L-цитруллина. Вероятно, расщепление этой аминокислоты осуществляется обнаруженной нами ранее орнитинтранскарбамилазой, и образовавшийся орнитин служит субстратом для биосинтеза пролина.

Таблица 1  
Биосинтез пролина из различных предшественников  
у дождевого червя, мкм на 1 г ткани

Органы	L-орн	L-арг	L-цит	L-глу
Целое тело	5,02	0	0,5	0
Кишечник	12,02	0	1,2	0

В табл. 2 приведены данные о корреляции активностей аргиназы и ферментов биосинтеза пролина при регенерации дождевого червя.

Активность изученных ферментов с 1-го по 3-й день регенерации увеличивается приблизительно в 1,5—2 раза, причем максимум ее отмечается на 3-й день.

Представляло интерес изучить, меняются ли субстраты-предшественники биосинтеза до и после регенерации (табл.3).

Данные таблицы свидетельствуют о том, что как при регенерации, так и до нее биосинтез пролина обеспечивают лишь цитруллин и особенно орнитин. При регенерации орнитин превращается в пролин зна-

чительно эффективнее (в 3,5 раза интенсивнее по сравнению с дорегенерационным периодом).

Таблица 2

Изменение аргиназы и ферментов биосинтеза пролина кишечника при регенерации, мкм на 1 г ткани

Исходные активности		Аргиназа			Ферменты биосинтеза пролина		
Аргиназа	Ферменты биосинтеза пролина	Дни регенерации					
		1	2	3	1	2	3
1733	5,2	2106			12,8		
1840	5,0		2300			13,2	
1705	5,7			2336			15,7

Таблица 3

Биосинтез пролина из различных предшественников до и при регенерации дождевого червя, мкм на 1 г ткани

До регенерации				При регенерации			
L-орн	L-арг	L-цит	L-глу	L-орн	L-арг	L-цит	L-глу
3,49	0	1,64	0	13,0	0	1,70	0

Для изучения указанного вопроса на уровне ранее обнаруженных [2] изоэнзимов аргиназы мы подвергали гель-фильтрации экстракт кишечника на сефадексе G—150 (рис. 1).

Как показывает приведенная на рис. 1 кривая, активность I изоэнзима при регенерации повышается почти в 9 раз, а II изоэнзима—в 1,5 раза.

На рис. 2 показано изменение изоэнзимного спектра орнитинтрансаминазы (ОТА) и пирролин 5-карбоксилат редуктазы (П5КР). Данные четко свидетельствуют о повышении активности при регенерации обнаруженных двух изоэнзимов, ОТА и особенно П5КР. Сопоставляя данные об изменении изоэнзимов аргиназы и ферментов биосинтеза пролина, можно сказать, что I изоэнзим, активность которого при регенерации увеличивается больше, по-видимому, функционирует в направлении биосинтеза пролина. Очевидно, усиление биосинтеза пролина необходимо для обеспечения синтеза нужного при регенерации коллагена. Не исключается также вероятность использования пролина как энергетического субстрата, как это показано в отношении насекомых [10].

Взаимосвязь аргиназы и ферментов биосинтеза пролина подтверждается также прямой корреляцией их активности при заживлении кожи крыс. При регенерации ткани последних отмечались длительное повышение активности аргиназы и интенсивный синтез коллагена, что

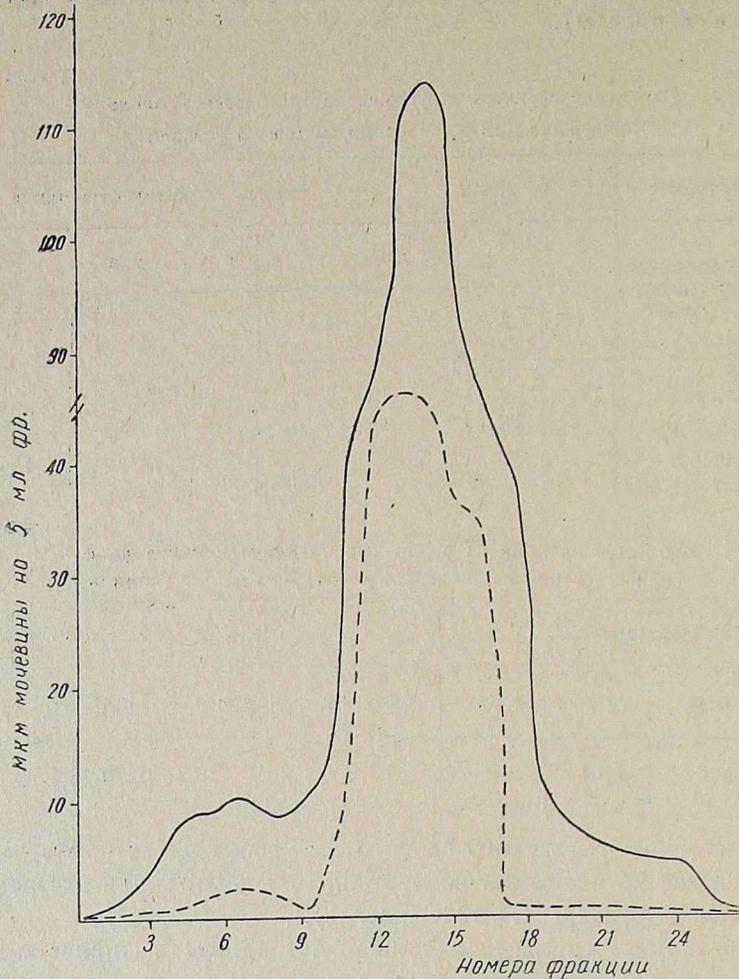


Рис. 1 Фракционирование экстракта аргиназы кишечника дождевого червя.  
 - - - до регенерации, — после регенерации.

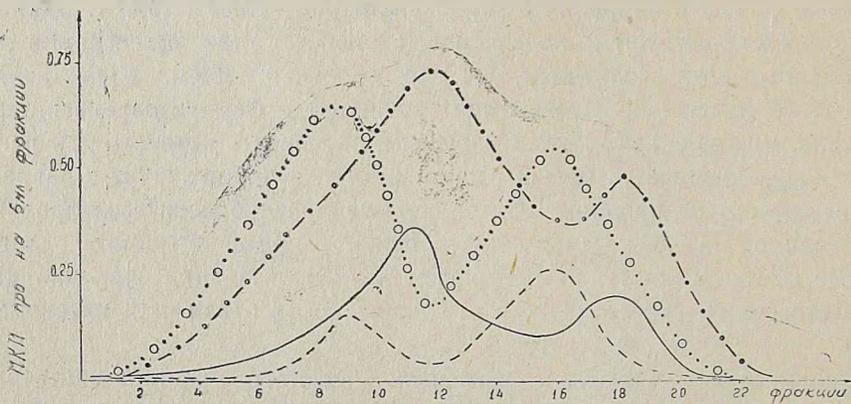


Рис. 2. Изменение изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина<sup>о</sup>  
 (ОТА, ПБКР) кишечника дождевого червя при регенерации.  
 до регенерации — ОТА, - - - ПБКР,  
 после регенерации - · - · - ОТА, - - ○ - - ПБКР.

приводило к повышению потребности в пролине, причем активность аргиназы повышалась в 1,5 раза [7].

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

Поступило 16.IV 1982 г.

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԵՎ ՊՐՈԼԻՆԻ ԲԻՍԻՆԹԵԶԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ  
ՓՈԽԱԳԱՐՁ ԿԱՊԸ ԱՆՁՐԵՎՈՐԴԻ LUMBRICUS TERRESTRIS  
ՏԵՍԱԿԻ ՌԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Ա. Խ. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, Խ. Գ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է արգինազայի և պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների հարաբերակցությունը անձրևորդի աղիներում՝ նրա ռեգեներացիայի ընթացքում: Նշված ֆերմենտների ակտիվությունը ռեգեներացիայի պրոցեսում ավելանում է 1,5—2 անգամ:

Ուսումնասիրվել է նաև արգինազայի և պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների (ՕՏԱ և Պ5ԿՌ) իզոէնզիմային սպեկտրը:

Արգինազայի առաջին իզոէնզիմի ակտիվությունը ավելանում է 9 անգամ, իսկ երկրորդինը՝ 1,5 անգամ: Հավանաբար առաջին իզոէնզիմը գործում է պրոլինի բիոսինթեզի ուղղությամբ:

RECIPROCITY OF ARGINASE AND ENZYMES OF PROLINE  
BIOSYNTHESIS IN THE INTESTINES DURING EARTHWORM  
LUMBRICUS TERRESTRIS REGENERATION

M. A. DAVTIAN, A. Kh. AGADJANIAN, Kh. G. GASPARIAN

The correlation between arginase activity and that of the enzymes of proline biosynthesis in the intestines during the regeneration of earthworm has been investigated. The activity of the both fermentative systems during the regeneration is increased by 1,5—2 times. Also investigated is the change in the isoenzyme spectrum of arginase and the fermentative system of proline biosynthesis.

The activity of the first isoenzyme of arginase is increased by 9 times, and of the second — by 1,5 times. Apparently, the first isoenzyme is functioning in the direction of proline biosynthesis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян А. Х., Арутюнян Л. М., Биол. ж. Армении, 32, 12, 1979.
2. Гаспарян Х. Г., Агаджанян А. Х. Молодой научн. работник, ЕГУ, 34, 2, 1981.
3. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 1956, 121, 1944.
4. Duweini A. K., Ghabbour S. L. Ann. Zool. Ecol. Anim., 4, 495, 1967.
5. Edwards C. A., Loffy J. R. Biology of fathworms., London, 1977.
6. Gates G. E. Trans. Am. Philo. Soc., 62, 7, 1972.
7. Rao M. V. R., Mishra O. P., Santhanam K., Vijayazaghavan P. K. Nutr. Repts Int., 22, 167, 1980.
8. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1199, 1949.
9. Reddy S. R. R., Cambell J. W. Biochem. J., 115, 495, 1969.

10. Sactor B., Childrees C. Arch. Biochem. Biophys., 120, 583, 1967.
11. Tillingast E. K. J. Exp. Zool., 166, 295, 1967.
12. Tillingast E. K., McInnes D. C., Djuffill R. A. Comp. Biochem. Physiol., 1087, 1969.
13. Lhinkin L. J. Exp. Zool., 73, 43, 1936.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 8, 1988

УДК 581.1.28:634.8(479.25)

## ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ПЛОДОНОСНОСТЬ ВИНОГРАДА СПИТАК АРАКСЕНИ И НЕРКЕНИ

К. С. ПОГОСЯН, Э. А. АРУТЮНЯН, И. А. СКЛЯРОВА

Изучалась потенциальная и практическая плодородность почек винограда сорта Спитак Араксени и Неркени, а также количество дней, необходимых для распускания почек и корнеобразования на одноглазковых черенках.

*Ключевые слова:* виноград, плодородность.

Наиболее распространенным в сельскохозяйственной экономике методом оценки плодородности виноградного растения является подсчет урожая. Галет [15] выражал плодородность количеством полученного урожая, собранного с одного куста, в кг или в гектолитрах вина, получаемого с одного га. Однако эти методы не учитывают факторов, влияющих на количество урожая, таких как цветение почек, число соцветий и их размеры в почках, расположение почек на побеге и ряд других.

Одним из простых аналитических методов выражения плодородности является определение среднего числа гроздей в расчете на лозу и на один, средний для лозы, глазок [17]. При подсчете «реального коэффициента плодородности» Балтату [8] учитывал и величину цветения почек. Но для более объективного прогнозирования урожая в зимний период необходимо учитывать и положение почки на побеге [13, 18].

Целью настоящего исследования явилось изучение потенциальной и практической плодородности почек винограда сорта Спитак Араксени и Неркени с учетом месторасположения почек на плодородном побеге.

*Материал и методика.* Десять побегов, содержащих по десять почек винограда обоих сортов, черенковали в середине февраля и высаживали в кюветы на проращивание в теплице без нарушения очередности почек. Количество почек на побегах обусловлено длиной плодовой стрелки, оставляемой на кустах при весенней обрезке и не превышающей 10 глазков. Потенциальная и практическая плодородность почек определялись согласно предложенному Бессюсом методу определения реальной плодородности [10, 11]. Для показателя плодородности каждой почки рассчитывалась квадратическая ошибка  $m$ , на основании которой подсчитана и приведена ошибка опыта  $m_D$  для плодородности побега [7].