

Число же Т-2 РОК максимально увеличивалось через 15 суток — на 44,8%.

В лимфатических узлах количество Т-1 РОК увеличивалось и держалось на высоком уровне в течение всего периода исследований, а в тимусе наибольшее количество их отмечалось на 7 сутки, что на 13,6% больше, чем в контроле, причем популяция Т-2 РОК не была обнаружена.

Таким образом, при применении гентамицина до иммунизации эритроцитами барана наблюдающееся увеличение числа РОК выражено меньше, чем при введении его после иммунизации; исключение составляют клетки Т-1 на 9 сут и Т-2 на 15 сут в селезенке, а также клетки Т-1 в лимфатических узлах. В случае антигенного раздражения эритроцитами после введения гентамицина, когда уже имело место взаимодействие антибиотика с иммунокомпетентными клетками, эритроциты не в состоянии в той же степени стимулировать эти клетки, что согласуется с литературными данными [3].

Исходя из изложенного, важно отметить, что пролиферация иммунокомпетентных клеток особенно чувствительна к гентамицину в индуктивной фазе клеточного митоза.

Следовательно, применение гентамицина аэрозольно в дозе 1500 мг/л аэрозольной камеры после и до иммунизации эритроцитами барана повышает количество иммунокомпетентных клеток. При одновременном введении антибиотика с эритроцитами существенных изменений не установлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курцис И. М. Антибиотики, 1, 71—74, 1976.
2. Славина Е. К. Антибиотики, 1, 75—79, 1976.
3. Гальдберг Е. Д., Михайлова Т. Н., Зингер Г. В., Щубина Т. С., Колзона Ю. Т., Крафт Л. А. Антибиотики, 8, 734—739, 1977.
4. Zaalberg O. B. Nature, 1231—1233, 1961.
5. Hashitt J. S. J. Exp. Med., 133, 1113—1116, 1972.
6. Gowans J. L., Knight A. J. Proc. Roy. Soc. Biol., 159, 257, 1968.

Поступило 5.1.1980 г.

Биолог журн. Армении, № 2, (43), 1990

УДК 576.85.5:577.15

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА АРГИНАЗЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

А. А. НИКОЯН, Л. Р. ТУМАНЯН, С. В. ЧУБАРЯН, Л. М. АРУТЮНЯН

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

Осуществлена частичная очистка аргиназы поджелудочной железы крыс. Обнаружены два изоэнзима аргиназы. Они обладают одинаковым сред

Сокращения: ГАМК—γ-аминомасляная кислота; ЭДТА—этилендиаминтетраацетат; ПХМБ—парахлормеркурибензоат.

ством к аргинину и не ингибируются ГАМК. Лизин ингибирует конкурентно, а пролин — некокурентно один из выделенных изоэнзимов, не влияя на другой. ЭДТА и ПХМБ в разной степени подавляют активность обоих изоэнзимов аргиназы поджелудочной железы крысы.

Իրականացվել է տոնետի Լեթատամբուսային գեղմի արգինազայի մասնակի մաքրում. Հայանարևրվել են արգինազայի երկու իզոէնզիմներ: Փրանք ջուրայրերում են միեկույն ինամակցոսթյուն արգինինի եկամտամբ, չեն արգելակվում պ-ամինակարազամբովել: Կիտր' մրցակցային, իսկ պրոլինը ոչ մրցակցային կետի արգելակում են անգամայած իզոէնզիմներին մեկը՝ շարժելով մյուսի վրա: ԷԴՏԱ-ն և ՊՔՄԲ-ն տարբեր չափով ընկճում են տոնետի Լեթատամբուսային գեղմի արգինազայի երկու իզոէնզիմներին ակտիվությունը:

The rat pancreas arginase has been partially purified. Two isoenzymes of arginase have been found. They have the same affinity with arginine and are not inhibited by glutamic acid. Lysine competitively and proline — non-competitively inhibit one of the enzymes, but do not affect the other one. EDTA and p-hydroxymercuribenzoate in different degrees inhibit the activities of both isoenzymes of rat pancreas arginase.

Аргиназа — поджелудочной железы

Общепризнанной ролью аргиназы в метаболизме уреотелических организмов является ее функция в цикле мочевинообразования. Наиболее полно охарактеризована аргиназа печени крысы, находящаяся в высокоочищенном состоянии. Она состоит из четырех субъединиц с молекулярной массой 30000, активизируется ионами марганца и для полной активности нуждается в четырех молекулах металла на молекулу фермента [7]. Показано, что триптофановые и гистидиновые остатки важны для проявления активности аргиназы печени крысы [5]. Роль этих остатков в механизме действия фермента пока не выяснена. Ясно только, что падение активности аргиназы вследствие модификации этих остатков не связано с нарушениями в четвертичной структуре фермента, поскольку не наблюдается ни диссоциации фермента на субъединицы, ни агрегации.

Однако наряду с ферментом (уреотелическим), участвующим в цикле мочевины, в природе широко представлены и другие, неуреотелические, формы его, не связанные с циклом мочевинообразования [1, 16]. Этот тип аргиназы обнаружен в различных органах и, как показано на крысах, в отличие от уреотелического печеночного фермента, обнаруживаемого уже в зародышевой ткани, появляется позднее [6]. Эта аргиназа может принимать участие в биосинтезе пролина, регуляции содержания полиамидов, лимитировании аргининбогатых гистонов [8]. Из неуреотелических форм аргиназы довольно подробно изучен почечный фермент, что позволило выявить различия между указанными двумя типами по ряду свойств: локализации, поведению при ионообменной хроматографии, активированию ионами марганца, иммунологическим свойствам и т. д. [8, 15].

Исследования по аргиназе поджелудочной железы в доступной литературе нами не обнаружено, лишь в работе Грингард и сотр. [6] отмечается наличие аргиназной активности в поджелудочной железе крысы.

Нами осуществлена описка аргиназы поджелудочной железы крысы

и изучены некоторые свойства (Km, Ki, влияние ПХМБ и ЭДТА) выделенных в ходе очистки двух изоэнзимов фермента.

Материал и методика. Опыты проводили на белых крысах. Животных декапитировали, быстро шпателькали поджелудочную железу (2—3 г), промывали и готовили гомогенат (20%) в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,4) с 0,01 М $MnCl_2$ и 0,005 М аргинина. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера-Элвельджа с тефлоновым пестиком (5 раз по 30 секунд).

Аргиназную активность определяли методом Ратшер [14], выражали в микромолах мочевины, удельную активность—в мкМ мочевины/мг белка. При необходимости реакционную смесь после инкубации центрифугировали. Мочевину определяли методом Арчибалда [4]. Белок по Лоури или спектрофотометрически на СФ-16 при длине волны 280 нм.

Ki определяли графическим методом Лайнувер-Бэрка, L-аргинин добавляли в инкубационную среду в количестве 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 и 480 мкМ. Ki определяли по методу Диксона, аминокислоты добавляли в инкубационную среду в количестве 5, 10, 25, 50 и 100 мкМ в присутствии 50 и 200 мкМ аргинина. ПХМБ применяли в концентрации 10^{-4} — 5×10^{-5} М.

Результаты и обсуждение. Очистку аргиназы поджелудочной железы крыс осуществляли нижеприведенными этапами.

После центрифугирования при 18000 об/мин в течение 30 мин 20%-ного гомогената основная часть активности (2980 из 3320) обнаруживалась в надосадочной жидкости (табл. 1). Последнюю затем нагревали при 15° в течение 10 минут. Предварительно температуру ферментного

Таблица 1. Этапы очистки аргиназы поджелудочной железы крыс

Этап	Общая актив- ность, мкМ мочевины	Общая белок, мг	Уд. актив- ность, мкМ мочевины/мг	Очи- тка	Вы- ход, %
Гомогенат	3320	8,4	3,8	—	—
Надосадочная жидкость	2980	4,0	8,3	—	89,7
Осадок	340	—	—	—	—
Термическая обработка	3020	112	27,0	7,1	91,2
Гельфильтрация, сефадекс G-150	2790	—	28,3	10,1	81,7
Высаживание (NH ₄) ₂ SO ₄	578	3,9	66,4	17,4	77,3
ДЭАЭ—целлюлоза	—	—	—	—	—
I изоэнзим	169	—	—	—	—
II изоэнзим	2807	17	168,0	44,3	86,0

препарата доводили до необходимой в более горячей водяной бане (55°). По истечении указанного времени смесь охлаждали в ледяной бане, затем центрифугировали при 18000 об/мин 30 минут.

Полученную после термической обработки надосадочную жидкость подвергали гельфильтрации на колонке с сефадексом G-150 (2X75 см), насыщенным трис-НСl буфером (рН 7,4) с 0,01 М $MnCl_2$ и 0,005 М аргинина. Объем фракций 5 мл. Аргиназа элюировалась с высокомолекулярными белками во фракциях 14—25 одним пиком.

Смесь активных фракций после гельфильтрации подвергали высаживанию сульфатом аммония при постоянном перемешивании в течение 30 мин на магнитной мешалке. Аргинин осаждался в пределах насыщения 20—30%. Для избавления от сульфата аммония выпавший осадок после центрифугирования при 18000 об/мин в течение 30 мин растворяли в 4 мл используемого буфера и пропускали через колонку с сефадексом G-50 (1,6X45 см).

После высаливания ферментный препарат наносили на колонку с ДЭАЭ—целлюлозой, насыщенной используемым буфером (1,6×18 см). Аргиназа выходила двумя пиками: первый, слабо выраженный—элюировался буфером, второй, более активный—0,5—0,75 М NaCl в буфере. Таким образом, получен очищенный в 44 раза препарат с высоким выходом—86%.

Полученные частично очищенные препараты аргиназы использовались далее для изучения некоторых свойств фермента.

Предварительное изучение влияния продолжительности хранения препаратов при +4° на сохранность активности выявило различия в выделенных двух формах (табл. 2). Оказалось, что активность первого

Таблица 2. Влияние продолжительности хранения на активность изоэнзимов аргиназы поджелудочной железы крыс (активность в мкМ мочевины в пробе)

Изоэнзим	Дни							
	I	IV	VIII	XII	XVI	XX	XXIV	XXVIII
I	0,45	0,49	0,0	0,43	0,39	0,37	0,36	0,37
II	1,86	1,75	1,17	0,98	0,34	0,29	0,23	0,21

фермента остается на первоначальном уровне в течение 8 дней, затем она несколько падает и к концу месяца сохраняется около 80% ее. Вторая же форма уже к 12 дню теряет почти половину активности, сохраняя к концу месяца лишь 11% ее.

Определение кажущихся K_m выделенных двух форм аргиназы поджелудочной железы крыс для аргинина показало их высокое сродство к субстрату: 10^{-3} М для первого и $1,8 \times 10^{-2}$ М для второго изоэнзима.

Согласно литературным данным, орнитин, лизин, ГАМК, пролин являются ингибиторами аргиназ различного происхождения [2, 8, 9]. Наши исследования показали, что ГАМК не влияет на активность обеих выделенных форм аргиназы, а лизин и пролин ингибируют лишь I изоэнзим, причем лизин—конкурентно, а пролин—неконкурентно (табл. 3).

Для выяснения роли и степени участия функциональных групп в проявлении активности и сохранении нативной конформации фермента широко используются реагенты на различные функциональные группы. ПХМБ, согласно литературным данным, не ингибируя уреотелическую аргиназу, полностью подавляет активность урикогелических форм фермента [3, 10—12].

Результаты наших исследований обнаружили некоторые различия в поведении выделенных новообменной хроматографией двух изоэнзимов аргиназы поджелудочной железы крыс в присутствии ПХМБ. Если I изофермент сохраняет свою активность в присутствии реагента (за исключением его наиболее высокой концентрации), то II—обнаруживает некоторое падение активности при концентрации 10^{-3} — 10^{-4} М (табл. 4). Подобное поведение может говорить об отсутствии сульфгидрильных групп в активном центре I изофермента, но не исключает возможности их участия в проявлении активности второго.

Таблица 3. Значение кажущихся K_i (М) изоэнзимов аргиназы поджелудочной железы крыс

Аминокислоты	Изоэнзимы	
	I	II
Лизин	6.7×10^{-2}	не инг.
Пролин	4.2×10^{-2}	не инг.
ГАМК	не инг.	не инг.

Таблица 4. Ингибирование ПХМБ активности изоэнзимов аргиназы поджелудочной железы крыс (%).

ПХМБ (М)	Изоэнзимы	
	I	II
10^{-4}	8.6	16.3
10^{-5}	0	16.3
$5 \cdot 10^{-7}$	0	9.3
10^{-6}	0	7.0
$5 \cdot 10^{-7}$	0	0

Нами исследовалось также влияние ЭДТА, который, связывая обратимо двухвалентные катионы, может ингибировать ферменты, каталитическая активность которых проявляется лишь в присутствии этих ионов. Диссоциация аргиназы печени крыс в присутствии ЭДТА и потеря ею активности показано Порембской [13]. Добавление ионов марганца приводило к реассоциации субъединиц и восстановлению ферментативной активности. В используемой нами концентрации (0,01 М) ЭДТА в разной степени подавлял активность I и II изофермента аргиназы поджелудочной железы крыс (на 13 и 39% соответственно), что может указывать на наличие в наших препаратах двухвалентных катионов, связанных с проявлением аргиназной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М. А., Бунягян Г. Х. Биохимия, 10, 412, 1970.
2. Давтян М. А., Арцунян Т. Г., Хачатрян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 7, 28, 1976.
3. Туманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мозесян А. С. Биолог. ж. Армении, 36, 6, 485, 1983.
4. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1941.
5. Greengard O., Sahib M. K., Klotz W. E. Arch. Biochem. Biophys., 137, 477, 1970.
6. Baranczyk-Kurta A., Poremska Z., Mochnacha I. Acta Biochim. Polon., 23, 151, 1976.
7. Hirsch-Koib H., Koib H. J., Greenberg D. M. J. Biol. Chem., 246, 395, 1971.
8. Kajsen G. A., Strecker M. J. Biochem. J., 133, 779, 1973.
9. Kesava R. K. V., Pals S. F., Barat C. V. J. Brit. Cancer., 30, 129, 1974.
10. Mora J., Mariuscillo L., Ortiz-Pineda L., Soberon G. Biochem. J., 95, 28, 1965.
11. Mora J., Tarrach R., Bojallil L. F. Biochem. Biophys. Acta, 118, 206, 1966.
12. Muszynska G., Rdzfer J. Acta Biochim. Polon., 17, 217, 1970.
13. Poremska Z. Enzyme, 15, 193, 1973.
14. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1483, 1949.
15. Szzyrpeł-Osiocka I., Robin L., Poremska S. Acta Biochim. Polon., 30, 83, 1983.
16. Spolarics Z., Bond J. S. Arch. Biochem. Biophys., 260, 469, 1988.

Получено 27.II 1989 г.