

3. Горювая А. И., Огинова И. А. V съезд ВОГиС им. П. И. Вавилова. Тез. докл. 107, М., 1987.
4. Ковда В. С., Глазюнская М. А., Сиколов М. С., Стрехозов Б. Л. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 120—124, 1977.
5. Королёва И. С., Кисьяненко А. Г., Портенко Л. Г., Рябова И. М. В сб.: Генетические последствия загрязнения окружающей среды, 3, 145—152, М., 1980.
6. Куинер Г. Л. В кн.: Гумусовые удобрения, теория и практика их применения, 8, 94—97, Днепрпетровск, 1983.
7. Соколов М. С. В сб.: Профилактическая токсикология, 2, 1, 163—173, М., 1984.
8. Mericle L. W., Mericle R. P. Genetics, 73, 4, 575—582, 1973.

Поступило 22.VI 1990 г.

Биолог журн Армении, № 9 (43), 1990

УДК 577.1:616—081:688.9

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ДИЭТИЛЕНИТРОЗАМИНОМ

А. С. МИКАЕЛЯН, М. А. ДАВТЯН, Г. Р. ВАРДАПЕТЯН\*

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и кафедра биофизики\*

Показано, что выявляемые в процессе опухолеобразования, индуцированного диэтилнитрозамином, изменения активности аргиназы отражают происходящие при этом изменения в функциональном статусе печеночной ткани. Обсуждается роль отдельных изоферментов в процессах опухолевого вырождения.

*Ուսումնասիրված էն արդինազայի ինչպէս ամբողջական, այնպէս էլ նրա առանձին իզոֆերմենտների ակտիվության՝ դիէթիլնիտրոզամինով հարուցված լյարդաբաղակազոյւղման ընթացքում տեղի ունեցող փոփոխությունները Յուլյո է տրված, որ արդինազայի ակտիվության՝ ուսուցարարչւման ընթացքում բացահայտող փոփոխությունները արտացոլում են լյարդի նյութամերի ֆունկցիոնալ կարգավիճակի՝ այդ ընթացքում տեղի ունեցող փոփոխությունները Քննվում է առանձին իզոֆերմենտների դերը ուսուցարչին ալլասերման ընթացքում:*

There have been investigated changes of both the total arginase activity and that of its separate isoenzymes in the process of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. We have demonstrated that arginase activity changes during tumor generation reflect changes occurring thereat in the functional state of liver tissue. There has been discussed the role of separate isoenzymes in the process of tumor degeneration.

*Аргиназа—хроматин—гепатоканцерогенез—диэтилнитрозамин.*

Как известно, детоксикация аммиака путем его включения в биосинтез мочевины осуществляется с помощью аргиназы, которая является одним из ключевых ферментов орнитинового цикла [3].

Проведенные ранее эксперименты показали, что активность аргиназы при опухолеобразовании претерпевает существенные изменения. Однако, если в гепатомах с высокой скоростью развития наблюдается

Сокращения: ДЭНА—диэтилнитрозамин.

значительное возрастание активности фермента [6], то в гепатомах с малой скоростью образования она значительно ниже контрольных величин [11]. Кроме того, ферментные системы мочевиного цикла вообще, и аргиназы в частности, гораздо интенсивнее индуцируются гормонами стероидной природы в опухолевых тканях, чем в нормальных [15]. Неоднозначная реакция аргиназы, вероятно, в известной мере обусловлена существованием двух молекулярных форм, которые отличаются генетически [1]. Изучение аргиназы млекопитающих в неопластических тканях [10] показало, что изоферменты ее (нейтральный, характерный для непеченочных тканей, и основной—печеночный) альтернативно реагируют на злокачественные перерождения.

Целью настоящей работы являлось исследование активности аргиназы печени крыс в процессе гепатокарциногенеза, индуцированного ДЭНА.

**Материал и методика.** Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar четвернедельного возраста (вес 100—125 г). Животных гепатэктомировали по методу Хиггинса и Андерсона [7]. Через 24 ч им интратрибуциально вводили раствор ДЭНА в 0,9 н NaCl из расчета 5 мг на 100 г веса.

Частично очищенный препарат аргиназы был получен по методу Шимке [14]. Для этого животных декапитуировали, а изолированную печень тщательно перфузировали 0,0025 М Трис-НСI буфером (рН 7,2), гомогенизировали в трех объемах 0,01 М Трис-НСI буфере (рН 7,2), содержащем 0,05 М  $MnCl_2$  и 0,01 М KCl, в течение 30 с при 0°, подвергали тепловой обработке при 60° в течение 15 мин, затем охлаждали до 0° и центрифугировали при 18000 об/мин в течение 30 мин для осаждения денатурированного белка и клеточных органелл. При этом 98% аргиназной активности обнаруживается в надосадочной жидкости. К последней, охлажденной до 0°, при постоянном перемешивании постепенно добавляли  $(NH_4)_2SO_4$  до 40%-ного насыщения, инкубировали 30—40 мин при 0°, центрифугировали при 18000 об/мин в течение 10 минут. К надосадочной жидкости добавляли  $(NH_4)_2SO_4$  до 70%-ного насыщения. Центрифугированием аргиназную активность переводили в осадок. Выход фермента—97%, степень очистки—около 70. Осадок ресуспендировали в 7—10 мл 0,01 М Трис-НСI буфере (рН 7,2), содержащем 1 мМ  $MnCl_2$ , и диализовали против того же буфера в течение 4 ч, меняя буфер через каждый час.

Для определения активности аргиназы [4] 0,1 мл гомогената инкубировали с 0,3 мл 0,01 М  $MnCl_2$  и 0,6 мл 0,025 М L-аргинина гидрохлорида в 0,1 М карбонатом буфере (рН 9,5) и инкубировали в течение 15 мин при 37°. Затем к пробе добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей 2,5% раствора вингидрина. Перемешивали и оставляли в течение 1 ч в кипящей водяной бане. При наличии аргинина за это время развивается стабильная красно-коричневая окраска. Затем пробы охлаждали и определяли поглощение на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 490 мμ против контрольной пробы, не содержащей L-аргинина. Полученные единицы экстинкции пересчитывали в микромоли орнитина с помощью предварительно построенной калибровочной кривой (0,1—4,0 мкМ орнитина). Результаты выражали в микромолях орнитина, образовавшегося за 1 ч в 1 мл гомогената в условиях опыта. Концентрацию белка в пробе определяли по методу Лоури.

Изоферменты аргиназы получали методом электрофореза в 7%-ном ПААГ по методу Редди и др. [13]. Переульфат аммония удаляли иррелектрофорезом в Трис-глициновом буфере (рН 8,3) при силе тока 3 мА на трубку в течение 30 мин.

Электрофорез проводили в течение 3—5 ч при силе тока 2—2,5 мА на трубку, пока краска не достигала конца геля.

Аргиназную активность в гелях определяли методом Ратнер и Паппас [12].

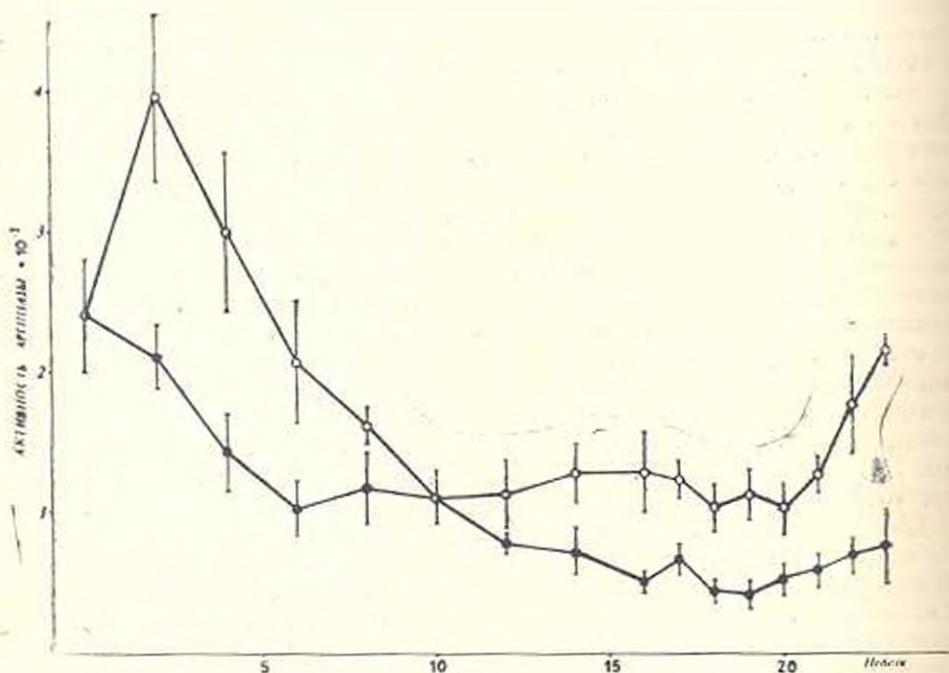
Гели разрезали на 0,5-сантиметровые последовательные сегменты, помещали в 0,3 мл 0,2 М глицинового буфера (рН 9,5) и 0,3 мл дистиллированной воды, гомогени-

зировали, после чего добавляли 0,1 мл 1 М L-аргинина. Смесь инкубировали при 37° 20 мин и фильтровали под вакуумом на стеклянных фильтрах. К фильтру добавляли 0,15 мл 50%-ной ТХУ, центрифугировали при 6000 г в течение 10 мин и определяли содержание мочевины в надсадке по модифицированному методу Мура и Кауфмана [9].

Активность фермента определяли в микромолях мочевины, образовавшейся за 1 мин в условиях нашего эксперимента.

Состав инкубационной смеси: 2,5 мл кислотной смеси (концентрированные  $H_2PO_4$  и  $H_2SO_4$  в соотношении 1:3 в присутствии водных солей  $MnSO_4$  и  $FeCl_3$ ), 1 мл кислого ферментного экстракта и 0,25 мл 3%-ного водного раствора ДАМО. Смесь тщательно перемешивали встряхиванием и кипятили в течение 45 мин в темноте в герметически закрытых пробирках. Охлажденные пробы колориметрировали при длине волны 478 нм против контроля на реактивы.

**Результаты и обсуждение.** На рис. показаны изменения активности аргиназы печени крыс в процессе регенерации и под действием ДЭНА. Как видно, в обоих случаях активность аргиназы претерпевает существенные изменения.



Изменение активности аргиназы печени крыс: (○-○-○) — при регенерации печени; (●-●-●) — при регенерации печени, обработанной ДЭНА.

В первые две недели регенерации она возрастает и превышает исходное значение в 1,6 раз. Затем, в течение последующих 10 недель, наблюдается падение активности аргиназы до определенного минимального значения, составляющего около 46% от исходного. На третьем этапе, между 10 и 20 неделями регенерации, она находится на низком уровне практически без изменений. И наконец, на четвертом этапе, от 20 до 23 недель, начинает возрастать и достигает 95% от контроля.

Подобная динамика изменения активности аргиназы может быть объяснена особенностями регенерирующей печени. В первые две

недели регенерации после частичной гепатэктомии масса печени быстро восстанавливается [2]. Происходит формирование двух- и многоядерных гепатоцитов [2], которые за счет усиления синтеза белка (ферментов) частично компенсируют функцию гепатэктomированной печени. При этом наблюдается резкое возрастание активности практически всех ключевых ферментативных систем.

На втором этапе, после восстановления массы печени, происходит постепенное уменьшение популяции дн- и полилондонных гепатоцитов, что приводит к снижению скорости синтеза нуклеиновых кислот, и это отражается также на скорости синтеза белка. На третьем этапе оба процесса проходят параллельно, что приводит к стабилизации активности аргиназы, однако на более низком уровне. И только на четвертом этапе, когда печень практически полностью восстанавливает свои функции, активность аргиназы возрастает до уровня контроля.

Несколько иная картина наблюдается при регенерации печени крыс, обработанных ДЭНА. Непрерывные инъекции канцерогена приводят к повреждению гепатоцитов, при одновременной частичной регенерации. Это приводит к резкому падению активности аргиназы в первые 6 недель до 42% (вместо 86% для регенерирующей печени) (рис. ).

В последующий период, 16—18 недель, наряду с появлением регенерирующих островков в печени начинают прогрессировать признаки, характерные для интоксикации ткани, что сопровождается падением активности аргиназы до 17% от исходного. В дальнейшем процесс злокачественной трансформации начинает прогрессировать, хотя при этом сохраняются островки регенерирующих гепатоцитов [8]. Активность аргиназы несколько возрастает и достигает 42% от исходного.

Изучение аргиназной активности показало, что если снижение ее весьма характерно для опухолеобразовательных процессов в печени, то в большинстве случаев злокачественных новообразований непеченочных тканей она повышается [5]. Эта неоднозначная реакция может быть обусловлена существованием различных изоферментов аргиназы, отличающихся генетически [3] и по-разному реагирующих на процесс новообразования. В связи с этим представляло интерес исследование изменений, происходящих в изоферментном спектре аргиназы печени крыс в процессе гепатоканцерогенеза.

Электрофорез в ПААГ выявил наличие трех зон с аргиназной активностью. В печени интактных крыс максимальной активностью (около 69%) характеризуется первая зона, представляющая собой, очевидно, основной пул уреотелической аргиназы, обладающей щелочными свойствами. Вторая зона, содержащая около 22% суммарной активности, представляет собой, по-видимому, пул «неуреотелической» аргиназы, а третья зона с активностью около 9% скорее всего состоит из отдельных диссоциированных субъединиц аргиназы, которые могут обладать частичной активностью.

Результаты экспериментов, приведенные в таблице, показывают существенные различия в динамике изменений относительной активности различных молекулярных форм аргиназы в процессе регенерации и при опухолеобразовании.

В первые 2 недели регенерации содержание основной, I фракции аргиназы возрастает до 77,3%, доля II фракции уменьшается до 13,8%, а содержание III практически не меняется и составляет 8,9% (табл.). Вероятно, на этом этапе быстро восстанавливается функ-

Относительное содержание (в%) отдельных фракций аргиназы печени крыс в процессе регенерации и гепатоканцерогенеза, индуцированного ДЭНА

Период регенерации, недели	Регенерация			Гепатоканцерогенез		
	I фрак.	II фрак.	III фрак.	I фрак.	II фрак.	III фрак.
K*	68.6±5.4	22.1±1.9	9.3±2.6	69.6±5.4	22.1±1.9	9.3±2.6
2	77.3±2.1	13.8±1.2	8.9±1.8	62.8±4.2	21.8±2.1	15.4±3.1
4	72.5±5.0	14.2±1.2	13.3±3.1	63.8±3.1	22.8±1.6	13.4±2.3
6	69.3±2.5	15.1±4.0	15.6±3.2	60.8±3.0	23.5±1.1	15.7±2.0
6	73.0±5.0	16.2±1.2	13.8±3.6	58.4±7.0	26.1±1.3	15.5±4.1
10	71.9±3.2	16.8±0.8	11.3±2.1	58.5±1.2	29.1±2.1	12.4±1.6
12	72.4±4.1	18.1±1.0	9.5±2.6	55.7±9.0	31.3±1.4	13.0±5.2
14	71.9±1.5	19.0±3.0	9.1±2.3	56.0±2.0	32.6±1.0	11.4±1.5
16	66.3±2.1	22.7±2.5	11.0±2.3	53.4±4.6	31.7±2.2	11.9±3.3
17	63.5±3.1	23.0±3.7	11.1±3.4	52.0±1.7	40.4±3.1	7.6±2.5
18	64.0±2.7	23.3±2.1	10.7±2.4	43.2±3.3	40.6±2.3	16.2±2.8
19	63.3±2.8	24.8±3.2	11.9±3.0	38.7±1.2	43.4±1.8	17.9±3.5
20	64.6±3.7	25.6±2.2	9.8±3.0	33.1±8.7	47.8±5.1	19.1±6.7
21	64.5±4.1	25.2±1.7	10.3±2.9	33.8±8.0	48.4±3.8	17.8±5.7

K\* — изоферментный спектр аргиназы печени крыс до гепатэктомии.

циональный статус печени, а восстановление ее «уротелических» свойств требует ускоренного синтеза аргиназы.

На втором этапе регенерации (4—14 недель), когда печень практически полностью восстанавливает свои функции (а также массу), содержание I фракции практически не меняется и сохраняется на уровне контроля. Несколько иная картина наблюдается в содержании II и III фракций. Содержание II фракции проявляет тенденцию к возрастанию и достигает величины контроля.

На третьем этапе наблюдается стабилизация соотношений всех фракций примерно на уровне контроля, хотя содержание I фракции несколько снижено, а II фракции — повышено. Это свидетельствует о том, что даже при полной регенерации функциональный статус печени полностью не восстанавливается.

Совершенно иная картина наблюдается в процессе гепатоканцерогенеза, индуцированного ДЭНА.

На первом этапе (до 4 недель) содержание II фракции практически не меняется и соответствует контролю. Одновременно наблюдаются некоторое понижение содержания I фракции и повышение III фракции.

На втором этапе (6—17 недель) опухолевого вырождения, который наступает после окончания инъекции ДЭНА, наблюдается неу-

явное падение содержания I фракции до 52% при одновременном возрастании содержания II фракции до 40,6%. Содержание III фракции уменьшается и сохраняется на уровне контроля.

И, наконец, на третьем этапе (18—21 неделя), когда происходит качественная трансформация ткани, катастрофически падает содержание I фракции до 33—34% при одновременном возрастании содержания II и III фракций до 48 и 18% соответственно.

Таким образом, как процесс регенерации, так и опухолеобразование сопровождается значительным изменением как суммарной активности, так и содержания отдельных фракций аргиназы печени крыс.

В процессе регенерации, когда наблюдается интенсивный синтез печеночной ткани (на втором этапе) и восстановление уреотелических свойств печени, происходит усиление синтеза I формы аргиназы, что одновременно приводит к уменьшению относительного содержания II формы при одновременном уменьшении общей аргиназной активности. На третьем этапе стабилизируется содержание фракции I и II, что указывает на завершение процесса регенерации печени. Несколько повышенное содержание II фракции, видимо, обусловлено частичным вырождением печеночной ткани.

В процессе опухолевой трансформации содержание фракции II на первом этапе соответствует контролю. На втором этапе, когда происходит общая интоксикация печени, общее падение активности аргиназы сопровождается возрастанием содержания II фракции. На третьем этапе, когда происходит полное перерождение нормальной ткани в опухолевую, резко падает содержание I фракции. Вырождение печеночной ткани сопровождается резким возрастанием II фракции. Увеличение популяции III фракции при этом можно объяснить синтезом неполноценных мономеров, что затрудняет процесс их ассоциации в суперкомплекс.

Таким образом, динамика общей аргиназной активности и соотношение ее отдельных изоформ указывает на важную роль аргиназы в процессах опухолевой трансформации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аязджян Н. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 32, 12, 1236—1238, 1979.
2. Карасюк Б. М. Регенерация, М., 1986.
3. Трапезникова С. С., Навасардянц Д. Т., Давтян М. А. Биохимия, 47, 12, 2022—2027, 1982.
4. Хромов В. А., Островский О. В., Косицина О. В., Спасов А. А., Кудик В. И. Лаб. дело, 8, 481—482, 1984.
5. White S. V. Indian S. Exp. Biol., 12, 5, 379—381, 1974.
6. Herzfeld A., Raper G. Biochem. S., 153, 2, 469—478, 1976.
7. Higgins G. M., Anderson R. M. Arch. Path., 12, 186—202, 1911.
8. Letnansky K., Vardapetian H. R. Cellular and Molecular Biol., 30 (2), 117—124, 1984.
9. Moore R. B., Kauffman N. S. Anal. Biochem., 33, 3, 263—270, 1970.
10. Nagarajan B., Gopulakrishna R. An Overview Journal of Scientific and Industrial Research, 39, 12, 809—818, 1980.
11. Nowell P. C., Morris H. P. Cancer Res., 29, 939—970, 1969.
12. Ratner S., Pappas A. S. Biol. Chem., 179, 3, 1189—1192, 1949.

13. Reddi P. K., Knox W. E., Herzfeld A. *Enzyme*, 29, 5, 305—314, 1975.  
 14. Schimke R. T. *Biochem.*, 239, 4, 3808—3818, 1964.  
 15. Wu C., Roberts E. H., Bauer J. M. *Cancer Res.*, 27, 956—961, 1967.

Поступило 3.V 1990 г.

Ծանոթ շրջ. Արմենու. № 9.(43).1990

ՆԾԿ 577.352

**ՏՐԻՊՏՈՖԱՆԻ ՄՆԱՅՈՐԻԻ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ NADPH-ԱԴՐԵՆՈԴՈՒՔՍԻՆ  
 ԻՆԻՊԻԿՏԱԳՆՑ ԱԴՐԵՆՈԴՈՒՔՍԻՆԻ ԷԼԵԿՏՐՈՆՆԵՐԻ  
 ՓՈՆԱՆՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ**

Ե. ՍԱՐԿԻՍԻԱ, Ս. ԽԱՐԳԱՆՅԱՆ, Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Հայաստանի ԳԱ կենսաբանության ինստիտուտ, Երևան

*N*-բրոմսուկցինիմիդով NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազի արիպտոֆանի մնացորդի ընթացակա մոդիֆիկացումը բերում է նրա մասնակցությանը վերականգնման ռեակցիաների արագության անկմանը: Մոդիֆիկացումը նվազեցնում է NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազի և ադրենոդոքսինի միջև կոմպլեքսառաջացումը, նրկու սպիտակուցների փոխազդեցության, ինչպես նաև նրանց մասնակցությամբ ընթացող վերականգնման ռեակցիաների պարամետրերը: Թույլ ևն աստիճան եզրակացնել, որ NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազի արիպտոֆանի մնացորդը մասնակցում է սպիտակուցի պրոսթետիկ խումբի՝ ֆլավին-ադենինդինուկլեոտիդից ադրենոդոքսինին էլեկտրոնների փոխանցմանը:

Химическая модификация остатков триптофана НАДФН-аденодокси редуктазы *N*-бромсукцинимидом приводит к снижению скорости восстановительных реакций с ее участием. Модификация снижает способность аденодокси редуктазы к комплексообразованию с аденодоксинам. Параметры взаимодействия двух белков, а также параметры восстановительных реакций с их участием позволяют сделать вывод об участии остатка триптофана аденодокси редуктазы в переносе электронов от простетической группы белка—ФАД—на аденодоксин.

Chemical modification of tryptophanyl residues of NADPH-adrenodoxin reductase by *N*-bromosuccinimide resulted in inhibition of electron transferring activity of the protein. The modification suppresses complex formation ability of adrenodoxin reductase with adrenodoxin. The parameters of interaction of two proteins and of NADPH-cytochrome *c* reduction bring to conclusion, that tryptophanyl residues in adrenodoxin reductase participate in electron transfer from prosthetic group. FAD, to adrenodoxin.

Էլեկտրոնի փոխանցում—NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազ—ֆլավինուկլեոտիդից

Մակերիկամների կեղևի միտոքոնդրիաներում տեղակայված է ստերոլոլային շերտանների հիդրոքսիլացման ֆերմենտային համակարգը, որի մեջ մտնում են ՖևԿ պարունակող NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազը (ԱդԻ), 2 Fe—2 S—4 C s պարունակող ադրենոդոքսինը (Ադ) և ցիտոքրոմ Խ 450-ների դասին պատկանող հեմ պարունակող ծայրային ֆերմենտը [12, 10]:

Ստամնասարսիթյուններից շուրջ ևն տվել, որ ԱդԻ-ի և Ադ-ի փոխազդեցության մեջ ներգրավվում են Ադ-ի կարբոքսիլ խմբերը [7] և տիրոզինը