

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШЕК *RANA RIDIBUNDA* ДО И ПОСЛЕ МЕТАМОРФОЗА

Н.А. АРЦРУНИ, Э.Х. БАРСЕГЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии, 375025

Изучен изоэнзимный спектр аргиназы печени лягушки *Rana ridibunda* до и после метаморфоза. Исследованием этих изоэнзимов при инактивации под действием ЭДТА и при pH 3.6 выявлено присутствие в печени лягушек уреотелических и неуреотелических изоэнзимов аргиназы, обладающих разными структурными особенностями, количественное соотношение которых меняется в ходе онтогенеза механизмами индукции и репрессии.

Ուսումնասիրված է *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի իզոֆերմենտային սպեկտրը մետամորֆոզից առաջ և հետո: ԷԴՏԱ-ի և pH 3,6 ազդեցության ներքո ինակտիվացման գործընթացում այդ իզոֆերմենտների վարքի ուսումնասիրությունը ապացուցում է գորտի լյարդում արգինազի ուռետելիկ և ոչ ուռետելիկ իզոֆերմենտների առկայությունը: Վերջիններս ունեն տարբեր կառուցվածքային առանձնահատկություններ և նրանց քանակական հարաբերությունը փոփոխվում է անհատական զարգացման ընթացքում ինդուկցիայի և ռեպրեսիայի մեխանիզմներով:

It has been investigated the isoenzymatic spectrum of *Rana ridibunda* frog's liver arginase before and after metamorphosis. The study of behavior of isoenzymes under the inactivation, caused by EDTA and low pH (3.6) proves the existence of ureotelic and nonureotelic isoenzymes in the frog's liver. These isoenzymes have different structural characteristics. Their quantitative ratio changes during the ontogenesis by mechanisms of induction and repression.

Аргиназа - инактивация - метаморфоз

Орнитиновый цикл мочевинообразования является основным механизмом нейтрализации аммиака у уреотелических организмов. Первые 4 фермента этого цикла обеспечивают биосинтез аргинина и имеют широкое биологическое распространение среди не только уреотелических, но и аммонотелических и урикотелических организмов. Казалось бы, присоединение аргиназы к этим 4 ферментам обеспечивало бы формирование орнитинового цикла. Относительно аргиназы Давтяном было выдвинуто и обосновано положение о существовании в природе двух видов аргиназ: одна - уреотелическая, присутствующая только в печени уреотелических организмов и функционирующая совместно с ферментами биосинтеза аргинина в виде единой системы - орнитинового цикла мочевинообразования; другая - неуреотелическая, имеющая общебиологическое распространение, встречающаяся во всех органах и тканях, функционирующая вне механизмов нейтрализации аммиака и имеющая иные метаболические функции [4, 5].

В дальнейшем были получены новые факты, подтверждающие существование в природе уреотелических и неуреотелических типов аргиназ [1, 2].

В свете этих представлений формирование уреотелизма нужно было рассмотреть как интеграцию 4 ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина, с уреотелической аргиназой, а не с аргиназой вообще.

Прекрасными объектами для изучения процесса формирования уреотелизма являются амфибии, которые в течение онтогенеза подвергаются метаморфозу, переходя от водной жизни обитания к наземной и соответственно от аммонотелизма к уреотелизму. С целью подтверждения решающей роли индукции уреотелической аргиназы в формировании уреотелизма при метаморфозе амфибий были предприняты дополнительные исследования по выявлению существующих различий изоэнзимов аргиназ до и после метаморфоза.

В данном исследовании проводилось сравнительное изучение поведения аргиназ при разных способах инактивации до и после метаморфоза.

Материал и методика. Объектом исследования служили лягушки *Rana ridibunda* (лягушка озерная) массой 100-120 г. Классификацию этапов развития проводили по Терентьеву [2]. Активность аргиназы определяли по методу [2]. Активность фермента выражали в мкмольх образовавшейся мочевины на 1 г свежей ткани. Инактивацию аргиназы проводили в присутствии ЭДТА в конечной концентрации 5×10^{-2} М.

Гельфильтрацию экстрактов печени, полученных после 30-минутного центрифугирования при 25000 g, проводили при 4° на колонке с сефадексом G-150 (Sephadex G-150, "Pharmacia", Швеция). На колонку (1,5x63) наносили 2,5-3 мл 2%-ного экстракта гомогената, уравнивали 0,005 М трис-HCl буфером, pH 7,4, скорость элюции 8 мл/час.

Результаты и обсуждение. В данной серии экспериментов предварительно изучался изоэнзимный спектр аргиназы печени головастиков (на поздних стадиях развития) и взрослых лягушек. Как видно из приведенных кривых гельфильтрации (рис. 1, 2) экстракта печени, до метаморфоза обнаруживаются 2 пика аргиназной активности, первый (I) изоэнзим фильтруется вместе с высокомолекулярной фракцией белков и обладает высокой ферментативной активностью, а второй (II) - фильтруется вместе с низкомолекулярными белками и обладает меньшей активностью. После метаморфоза (рис. 3) в экстрактах печени лягушек обнаруживается резко

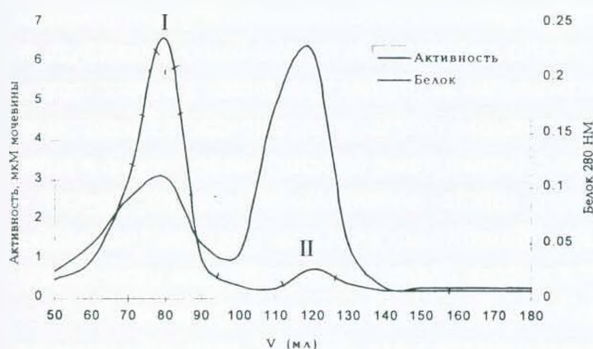


Рис. 1. Гельфильтрация аргиназы печени головастиков *R. ridibunda* (стадия 27-28).

выделенный один пик ферментативной активности, фильтрующийся с высокомолекулярными белками. Можем сказать, что при метаморфозе происходит резкая индукция одного изофермента (I) и репрессия другого (II).

Таким образом, нами были воспроизведе-

ны данные нашей лаборатории относительно изменения изоэнзимного спектра аргиназ печени лягушек в ходе онтогенетического развития [3]. При этом было выяснено, что по ряду физико-химических показателей константа Михаэлиса (K_m), молекулярная масса, константа ингибции (K_i) значительно различаются. Даже показатели I изоэнзима до и после метаморфоза несколько различаются по значениям K_m . Это могло быть результатом гетерогенности I изоэнзима, что и было подтверждено в экспериментах по дальнейшему фракционированию этого изоэнзима на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой. Действительно, I изоэнзим ионообменной хроматографией разделяется на 3 субфракции (1А, 1В, 1С), соотношение активностей которых в ходе развития меняется. При метаморфозе наблюдается индукция 1С и 1В, тогда как 1А не меняется. Было заключено, что в механизме формирования уреотелизма при метаморфозе существенное значение имеет индукция 1С и 1В. Очевидно, они и являются уреотелическими изоэнзимами, тем более по K_m , K_i и мол. массе они соответствуют уреотелическим аргиназам различного происхождения.

Как видно из табл. 1, аргиназа гомогенатов печени головастика на стадиях развития 27-28 и 28-29 при кислых рН постепенно инактивируется в течение 6 ч. После частичной очистки (гельфильтрация, G-150) препаратов на тех же стадиях развития время инактивации сокращается до 3 ч.

Наши исследования на взрослых лягушках (I) показали, что после 2-часового кислотного воздействия (рН 3,6) аргиназа экстракта печени инактивируется всего на 24%, тогда как аргиназа экстракта печени головастика на стадии 27-28 ингибируется на 48%, а на стадии 28-29 - на 45%, т. е. по мере приближения к метаморфозу аргиназная активность экстракта печени головастика по исследованному показателю приближается

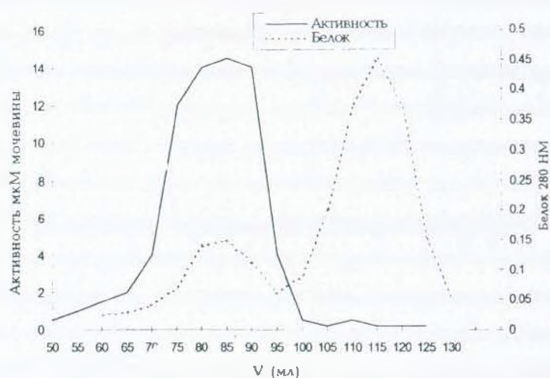


Рис. 2. Гельфильтрация аргиназы печени головастика *R. ridibunda* (стадия 28-29).

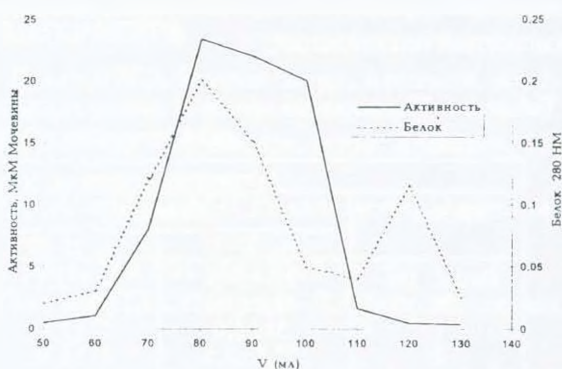


Рис. 3. Гельфильтрация аргиназы печени лягушки *R. ridibunda*.

к активности экстракта печени взрослых лягушек. Это, очевидно, является следствием указанных изменений изоэнзимного спектра аргиназ печени лягушек в течение онтогенеза, что подтверждается и результатами исследований I изоэнзима аргиназы, полученного гельфильтрацией экстракта печени головастика. На стадии развития 27-28 I изоэнзим при 2-часовом кислотном воздействии (рН 3,6) ингибируется на 55%, на стадии 28-29 - на 94%, т. е. почти столько, сколько у взрослых лягушек (1). Таким образом, в ходе развития лягушек меняется степень кислотной инактивации I изоэнзима аргиназы печени, что, вероятнее всего, является изменением количественного соотношения субфракций I изоэнзима (IA, IB, IC). Оценивая полученные данные по изучению кислотной инактивации изоферментов аргиназы, можем утверждать, что они подтверждают заключение об индукции при метаморфозе амфибий определенных изоэнзимов, имеющих характерное поведение при кислотной инактивации.

Таблица 1. Инактивация аргиназы печени головастика *R. ridibunda* при рН 3,6 на разных стадиях развития

Время, ч	Активность аргиназы, мкмоль/г белка			
	Экстракт		Аргиназа I	
	ст. 27-28	ст. 28-29	ст. 27-28	ст. 28-29
Исход. акт.	53,4±4,2	68±12,1	82,1±6,4	170±32
30'	48,7±3,2	60±3,1	50±3,5	44±9,6
1	38±2,8	54±2,4	41±2,4	15,8±3,4
2	27,6±2,5	37±6,3	37±2,3	10,2±2,7
3	16,7±2,4	21±5,6	18±1,7	7,3±1,8
6	9±2,2	13±3,2	-	-

Аргиназа экстракта печени лягушек, как и частично очищенная аргиназа (I изоэнзим, полученный гельфильтрацией и его субфракции IA, IB, IC, полученные ионообменной хроматографией на ДЭАЭ целлюлозе) значительно инактивируются сразу после добавления ЭДТА [1].

Таблица 2. Инактивация аргиназы печени головастика *R. ridibunda* под действием ЭДТА на разных стадиях развития

Время, мин	Активность аргиназы, мкмоль/г белка					
	Экстракт		Аргиназа I		Аргиназа II	
	ст. 27	ст. 28-29	ст. 27	ст. 28-29	ст. 27	ст. 28-29
Исх. акт.	43,7±2,8	68±12,1	61,4±5,6	170±32	16,6±1,2	13,5±0,98
1	0,72±0,05	1,72±0,42	3,3±0,4	6,8±1,4	16,6±1,2	13,5±0,98
30	0,44±0,03	1,6±0,2	4±0,6	6,8±1,4	0	0
60	0,43±0,03	1,7±0,18	3,02±0,18	6,8±1,4	0	0
120	0,44±0,03	1,6±0,2	2,87±0,12	6,8±1,4	0	0

Согласно данным табл. 2, ЭДТА сразу ингибирует аргиназную активность экстрактов, а также I изоэнзима, полученного гельфильтрацией экстрактов печени на различных стадиях развития. Таким образом, I

изоэнзимы по степени ингибирования ЭДТА до и после метаморфоза проявляют одинаковый характер. Что же касается II изоэнзима аргиназы, обнаруживаемого при гель-фильтрации экстракта печени только до метаморфоза, который репрессируется при метаморфозе и, очевидно, является неуретелическим, он не ингибируется в первые минуты действия ЭДТА, что обычно обусловлено наличием в молекуле фермента более прочно связанных с белком ионов Mn^{2+} .

Таким образом, полученные данные являются дополнительным доказательством присутствия в печени лягушек различных изоэнзимов аргиназы (обладающих разными структурными особенностями), количественное соотношение которых меняется в ходе онтогенеза механизмами индукции и репрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Н.А., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 49, 3-4, 156-157, 1996.
2. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 30, 6, 12-20, 1977.
3. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Месропян М.Б. Биолог. журн. Армении, 30, 12, 73-76, 1977.
4. Давтян М.А. Вопр. биохимии мозга, 46, 237-266, 1968.
5. Давтян М.А., Бунятян Г.Х., Геворкян Д.М., Петросян Л.А. Вопр. биохимии мозга, 6, 15-22, 1970.

Поступила 10.XI.1997