



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

ОРНИТИНКАРБАМОИЛТРАНСФЕРАЗНАЯ И АРГИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДВУСТОРОННЕЙ ИНТРАЦЕРЕБРО-ВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ИНЪЕКЦИИ АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА A β (25-35)

А.А. НИКОЯН, Л.Р. ТУМАНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
bio_chm@ysu.am

В мозгу крыс, интоксифицированных амилоидным пептидом A β (25-35), на фоне нарушения орнитинкарбамоилтрансферазы (ключевого фермента, отсутствующего в мозгу орнитинового цикла мочевинообразования) наблюдается двукратное увеличение аргиназной активности, что может быть связано с появлением уреотелической, т.е. участвующей в цикле мочевинообразования формой фермента. Отсутствие в мозгу животных, получавших после интоксикации паратгормон, активности орнитинкарбамоилтрансферазы и падение аргиназной активности до уровня контроля может быть связано с участием паратгормона в стабилизации клеточного Ca²⁺-гомеостаза, способствующей предотвращению развития болезни Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера – орнитинкарбамоилтрансфераза – аргиназа – паратгормон

A β (25-35) ամփոփողային պեպտիդով խիտահարված առնետների ուղեղում հայտնաբերվում է առողջ կենդանու ուղեղում բացակայող միզանյութի գոյացման օրնիտինային ցիկլի առանցքային ֆերմենտը՝ օրնիտինկարբամոյլտրանսֆերազը: Ձուգահեռ տեղի է ունենում արգինազային ակտիվության գրեթե կրկնակի բարձրացում, որը, հնարավոր է, պայմանավորված է ֆերմենտի ուրեոթելիկ, այսինքն միզանյութի գոյացման ցիկլում մասնակցող ձևի ի հայտ գալով: Ախտահարումից հետո պարատհորմոն ստացած կենդանիների ուղեղում օրնիտինկարբամոյլտրանսֆերազի բացակայությունը, ինչպես նաև արգինազի ակտիվության անկումը, ստուգիչի մակարդակի կարող է կապված լինել բջջային Ca²⁺-հոմեոստազի կարգավորման հետ, որն էլ հնարավոր է կանխի Ալցհայմերի հիվանդության զարգացումը:

Ալցհայմերի հիվանդություն – օրնիտինկարբամոյլտրանսֆերազ – արգինազ – պարատհորմոն

The key enzyme of urea formation in ornithine cycle, otherwise missing in the brain of healthy rats, was observed in the brains of rats intoxicated with amyloid peptide A β (25-35). Parallel to this approximately a doubled increase of arginase activity was taking place, which possibly was conditioned by the emergence of the ureotelic form participating in urea cycle. The treatment of intoxicated rats with parathormone results the absence of ornithinecarbamoyltransferase in their brains as well as the decrease of arginase activity to the control level. This can be related to the stabilization cell Ca²⁺-homeostasis, which makes it possible to prevent Alzheimer's disease development.

Alzheimer's disease – ornithinecarbamoyltransferase – arginase – parathormon

Болезнь Альцгеймера (БА) – дегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся прогрессирующим снижением интеллекта, расстройством памяти и изменением поведения. Причиной БА является отложение β -амилоидного пептида в ткани мозга с образованием нерастворимых фибрилл, нарушающих структуру и функции нервных клеток. β -амилоид – продукт изменения конформации нейроспецифического белка, образуется частичным протеолизом более крупного предшественника – APP (amyloid precursor protein) [6,12].

К настоящему времени болезнь хорошо изучена, характеризуется церебральной атрофией, утратой нейронов и синапсов, грануловакуолярной дегенерацией, глиозом, амилоидной ангиопатией, а также присутствием сенильных бляшек и альцгеймеровским перерождением нейрофибрилл. Кроме гибели нервных клеток, при БА в мозгу меняется уровень экспрессии белков, связанных с пластичностью или регенерацией. Меняется также активность ряда ферментов, причем заслуживает внимания тот факт, что не все из них связаны с определенными нейротрансмиттерными системами. Меняется активность ряда пептидаз, фосфатидилинозитолкиназы, фосфатидилинозитолфосфаткиназы, β -глюкуронидазы и холинтрансферазы [13]. Исследование тиаминзависимых ферментов в образцах височных долей обнаружило значительное падение активности ПВ-дегидрогеназы, α КГ-дегидрогеназы и транскетолазы у больных. Напротив, активность глутаматдегидрогеназы была в пределах нормы. На основании этого авторы сделали предположение о вероятной роли изменений в метаболизме или утилизации тиамина в развитии БА [5].

Материал и методика. Эксперименты проводились в сотрудничестве с лабораторией нейро-эндокринных взаимодействий Института физиологии НАН РА им. акад. Л.А. Орбели. Объектом служили крысы-самцы линии Альбино (250 ± 20 г). β -амилоидный пептид A_{β} (25-30), агрегированный согласно Maurice et al. [8] (1 мг/мл в стерильной дистиллированной воде при 37°C в течение 4 сут), инъецировался в латеральные желудочки мозга с обеих сторон.

Паратиреоидный гормон (ПТГ) вводился внутримышечно (10^{-9} М, 0,7 мл) в течение первой послеоперационной недели ежедневно, начиная со второго дня интоксикации. Животных забивали спустя 15-23 недели после введения A_{β} (25-35). Орнитинкарбамоилтрансферазная (ОКТ) и аргиназная активность определялась в мозгу, печени, почках и селезенке контрольных и подвергнутых интоксикации β -амилоидом крыс, а также после системного введения интоксифицированным крысам ПТГ.

Гомогенизация органов проводилась в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвейема тефлоновым пестиком. 20%-ный гомогенат центрифугировался для удаления ядерной фракции и неразрушенных клеток (3000 об/мин, 5 мин). В опытах использовалась надосадочная жидкость (экстракт).

Активность ОКТ определялась методом арсенолиза цитрулина [1].

Аргиназная активность измерялась по методу Ратнер и Паппас [11]. Активность выражалась в мкМ мочевины. Мочевину определяли методом Арчибальда в модификации Мура [10].

Результаты и обсуждение. В ряду вышеупомянутых данных об изменении активности ряда ферментов при БА, в том числе не связанных с определенными нейротрансмиттерными системами, наше внимание привлекло обнаружение экспрессии гена ОКТ – ключевого фермента цикла мочевины в мозгу больных БА, тогда как он отсутствует у контрольных субъектов. Обнаружена также экспрессия всех других ферментов цикла в мозгу больных [4]. Кроме того, увеличивается активность ОКТ в цереброспинальной жидкости. Авторы допускают включение нового пути цикла мочевины в мозгу [4]. Ранее было доказано отсутствие в мозгу орнитинового цикла [2].

Исходя из вышеизложенного, мы решили исследовать активность двух ферментов цикла мочевины – ОКТ и аргиназы в мозгу, печени, почках и селезенке крыс при интоксикации амилоидным пептидом A_{β} (25-35), а также последующем системном введении ПТГ. Применение ПТГ вызвано тем, что в клетке поступление, депонирование и выделение Ca^{2+} регулируется весьма сложной системой, где среди других факторов важная роль принадлежит паратгормону. Поскольку существенную роль в патогенезе БА играет нарушение клеточного Ca^{2+} -гомеостаза (КСаГ) в нервной ткани, ведущее к повышенной выработке и накоплению β -амилоидного пептида в результате изменений в молекуле APP [7, 9], стабилизация КСаГ может способствовать предотвращению развития БА.

Данные об активности ОКТ и аргиназы в мозгу и других органах крыс при интоксикации амилоидным пептидом A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ представлены в табл. 1 и 2.

Согласно данным табл. 1, ОКТ, отсутствуя в мозгу интактных крыс (ввиду отсутствия там орнитинового цикла), обнаруживается в нем через 15 недель после интоксикации амилоидным пептидом.

Таблица 1. Активность ОКТ в экстрактах гомогенатов различных органов крыс при интоксикации A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ (мкМ NH_3 /г ткани). $n=4$

Орган	К	A_{β} 15 нед.	A_{β} + ПТГ, недели					
			15	16	17	18	19	23
Мозг	0	$2,30 \pm 0,08$	0	–	0	–	–	–
Печень	$30,50 \pm 1,30$	$9,60 \pm 0,31$	$12,76 \pm 0,02$	$18,80 \pm 0,02$	$11,30 \pm 0,20$	$12,0 \pm 0,21$	$17,70 \pm 0,41$	$28,40 \pm 0,50$
Почки	$19,80 \pm 0,90$	$14,34 \pm 0,52$	$10,41 \pm 0,16$	$7,10 \pm 0,03$	$2,84 \pm 0,06$	$3,70 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,02$	0
Селезенка	$1,42 \pm 0,02$	$2,27 \pm 0,02$	$5,10 \pm 0,10$	$6,10 \pm 0,13$	$5,51 \pm 0,12$	$6,03 \pm 0,10$	$4,94 \pm 0,06$	$1,77 \pm 0,08$

Однако в тот же срок после интоксикации, но при последующем введении ПТГ, т.е. в условиях стабилизации КСаГ, что может способствовать предотвращению развития БА, активность ОКТ отсутствует. Она отсутствует также через 17 недель. Для других сроков данных нет, так как мозг забирался для патоморфологического анализа.

Результаты патоморфологического анализа срезов мозга крыс, получавших A_{β} , выявили значительную дегенерацию клеток почти всех областей гиппокампального комплекса, а электрофизиологические исследования обнаружили отклонения от нормы. В условиях применения ПТГ наблюдались реабилитационные сдвиги к норме [3].

Активность ОКТ в печени и почках падает после интоксикации, а в селезенке повышается. При введении ПТГ активность фермента в печени начинает повышаться и к концу эксперимента (23 недели) достигает активности у интактных крыс. Подобного положительного влияния ПТГ в случае фермента почек не наблюдается: понизившись после интоксикации, активность его продолжает падать и после введения ПТГ и к концу эксперимента достигает нуля.

Если через 15 недель после интоксикации амилоидным пептидом изменения в уровне аргиназной активности печени, почек и селезенки незначительны, то в мозгу она повышена почти в 2 раза ($91,3$ вместо $49,5$ в контроле) (табл.2). Подобное изменение уровня активности аргиназы совпадает с обнаружением ОТК в мозгу через 15 недель интоксикации. В тот же срок, но при введении ПТГ, т.е. в условиях, способствующих предотвращению развития БА, аргиназная активность понижена ($74,2$ вместо $91,3$), а через 17 недель она уже порядка контрольной.

Таблица 2. Активность аргиназы в экстрактах гомогенатов различных органов крыс при интоксикации A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ (мкМ мочевины/г ткани). $n=4$

Орган	К	A_{β} 15 нед.	A_{β} + ПТГ, недели					
			15	16	17	18	19	23
Мозг	49,5±2,70	91,3±2,80	74,2±5,20	—	40,4±2,9	—	—	—
Печень	13500±22	12600±98	13100±208	10350±155	5040±78	4050±63	3690±59	14100±105
Почки	640±34	756±45	460±48	432±28	558±29	403±40	378±35	532±36
Селезенка	65,2±4,13	60,7±3,80	59,8±2,70	62,1±3,70	50,4±2,80	48,2±3,10	47,2±2,30	58,5±4,10

Что касается печеночного фермента, то его активность через 15 недель после интоксикации, как и при введении ПТГ после интоксикации, фактически не меняется. В более продолжительные сроки она падает, но к концу опыта достигает уровня контроля.

Активность аргиназы почек и селезенки, несколько колеблясь в разные сроки, тем не менее близка к контрольной.

Среди данных по влиянию интоксикации амилоидным пептидом и последующего системного введения ПТГ на активность двух исследованных ферментов орнитинового цикла в различных органах крыс особый интерес представляет появление в мозгу интоксифицированных животных ОКТ — ключевого фермента цикла, отсутствующего в мозгу. Примечательно, что параллельно почти в два раза повышается активность аргиназы, которая хотя и присутствует в мозгу, но не связана с циклом мочевины (неуротелическая форма). Можно допустить, что увеличение аргиназной активности, возможно, связано с участвующей в цикле мочевины уреотелической формой фермента, что согласуется с предположением о появлении в мозгу страдающих БА нового пути цикла мочевины [4].

Отсутствие в мозгу животных, получавших после интоксикации ПТГ, активности ОКТ и падение аргиназной активности до уровня контроля может быть связано с участием паратгормона в стабилизации КСаГ, способствующей предотвращению БА.

Авторы выражают благодарность за предоставление экспериментального материала Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА и кафедре нормальной физиологии ЕГМУ им. М. Гераци

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А.Е., Северина И.С., Барская Ю.Е. О торможении орнитинового цикла мочевинообразования метил-DL-аспарагиновой кислотой. Биохимия, 21, с.738-745, 1956.
2. Давтян М.А. Ферменты орнитинового цикла в мозгу. Докт. дисс. 1970.
3. Мнацаканян В.Р., Худавердян Д.Н., Меликсетян И.Б., Чавушян В.А., Саркисян Дж.С. Электрофизиологическое и гистохимическое изучение эффекта паратиреоидного гормона на A_{β} индуцированной модели болезни Альцгеймера. Материалы Международной научной конференции "Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы", посвященной 80-летию со дня рождения акад. В.В.Фанарджяна, Ереван, с. 207-212, 2009.
4. Bensemain F, Hot D, Ferreira S, Dumont J, Bombois S, Maurage CA, Huot L, Hermant X, Levillain E, Hubans C, Hansmannel F, Chapuis J, Hauw JJ, Schraen S, Lemoine Y, Buée L., Berr C., Mann D., Pasquier F., Amouyel P, Lambert J.C. Evidence for induction of the ornithine transcarbamylase expression in Alzheimer's disease. Mol. Psychiatry, 14, 1, 106-116, 2009.

5. *Butterworth R.F., Besnard A.M.* Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 5, 4, 179-84, 1990.
6. *Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H.* Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* 331, 6156, 530-532, 1988.
7. *Mattson M.P., Chan S.L.* Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.*, 34, 4-5, 385-97, 2003.
8. *Maurice T., Privat A.* Sigma 1 receptor agonists and neurosteroids attenuate beta 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience*, 83, 413-428, 1998.
9. *Miller D.W., Cookson M.R., Dickson D.W.* Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neuron Glia Biol.*, 1, 13-21, 2004.
10. *Moore R.B., Kauffman N.J.* Simultaneous determination of citrulline and urea using dia-cetylmonoxime. *Anal Biochem.*, 33, 2, 263-72, 1970.
11. *Ratner S., Pappas A.* *Biosynthesis of urea I.* Enzymic mechanisms of arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.*, 179, 1183-1198, 1949.
12. *Sinha, S., Dovey, H. F., Seubert, P., Ward, P. J., Blancher, R. W., Blaber, M., Bradshaw, R. A., Arici, M., Mobley, W. C., Lieberburg, I.* The Protease Inhibitory Properties of the Alzheimer's Beta-Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 8983-8985, 1990.
13. *Terwel D., Bothmer J., Wolf E., Meng F., Jolles J.* Affected enzyme activities in Alzheimer's disease are sensitive to antemortemhypoxia. *J. Neurol. Sci.*, 161, 1, 47-56, 1998

Поступила 19.06.2015