



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи •
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 4 (60), 2008

АРГИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЧЕНИ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В АРМЕНИИ, КАК МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ МЕСТООБИТАНИЯ

Э. М. ЕГИАЗАРЯН, Э. Х. БАРСЕГЯН, Р. Г. ГРИГОРЯН,
М. А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, биологический факультет,
кафедры зоологии и биохимии, E-mail eduard@ysu.am*

Изучены особенности механизма формирования уреотелизма у 5 видов лягушек, обитающих в различных географических зонах Армении (от 740 до 2500 м над ур. м.). Показано, что механизмами индукции и репрессии изоферментный спектр аргиназы печени меняется на отдельных этапах онтогенетического развития амфибий, а также в зависимости от условий среды.

Эти изменения отражают существенные различия в регуляции биохимических процессов, что, очевидно, проявляется в возможностях выживания и развития в определенной среде и может рассматриваться как проявление “биохимической адаптации” к определенным условиям среды.

Аргиназа – изоферменты – уреотелизм – биохимическая адаптация

Հետազոտվել է ուրեոթելիզմի ձևավորման մեխանիզմը երկկենցաղների 5 տեսակների մոտ, որոնք տարածված են Հայաստանի տարբեր աշխարհագրական գոտիներում (ծովի մակարդակից 740-2500 մ բարձրությունների վրա): Ցույց է տրվել, որ լյարդի արգինազի իզոֆերմենտային սպեկտրը ինդուկցիայի և ռեպրեսիայի մեխանիզմներով փոխվում է ինչպես երկկենցաղների օնոգենետիկ զարգացման էտապներում, այնպես էլ շրջակա միջավայրի պայմաններից կախված:

Այդ փոփոխությունները արտացոլում են կենսաքիմիական պրոցեսների կարգավորման էական տարբերությունները, որոնք հավանաբար դրսևորվում են որոշակի միջավայրում գոյատևման և զարգացման հնարավորություններով և կարող են դիտվել որպես միջավայրի որոշակի պայմանների նկատմամբ կենսաքիմիական ադապտացիայի դրսևորում:

Արգինազ - իզոֆերմենտներ - ուրեոթելիզմ - կենսաքիմիական ադապտացիա

Properties of formation mechanisms of ureotelism for 5 species of frogs which inhabit (lives) different geographic areas of Armenia (from 740 to 2500, m above sea level) were studied. It was shown that the isoenzymatic spectrum of hepatic arginase is changed in the ontogenetic separate stages of amphibian development.

This changes reflect remarkable differences in the regulation of biochemical processes, which obviously, appears at the abilities to survive and develop in the certain environment and can be examined as a manifestation of biochemical adaptation to specified environmental conditions.

Arginase – isoenzyme - ureotelism - biochemical adaptation

Механизм формирования уреотелического типа экскреции азота, обусловленный сложным процессом метаболизма амфибий при переходе животного от водных условий обитания к наземным, является прекрасным примером биохимической адаптации, лежащей в основе морфофизиологической адаптации.

Все организмы в зависимости от вида экскрецируемого конечного продукта распада азотсодержащих соединений делятся на аммонотелические, выделяющие аммиак, уреотелические – мочевины и урикотелические – мочевую кислоту.

В жизненном цикле большинства амфибий происходит смена аммонотелизма на уреотелизм. Головастики амфибий, являющиеся водными формами, до метаморфоза выделяют аммиак. В результате метаморфотических изменений, ведущих к выходу животных на сушу, происходит переключение с аммонотелизма на уреотелизм.

Количество конечных продуктов азотистого обмена, а следовательно и тип азотистой экскреции, находятся в зависимости также от условий окружающей среды, в частности, сильное влияние оказывают засушливые условия, гиперосмотическая среда (например, морская вода), температура, диета.

Южно-американская шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* всю жизнь проводит в воде и в течение онтогенетического развития остается аммонотелическим организмом, т. е. азотистые шлаки у нее выводятся в основном в виде аммиака. Однако в периоды сильной засухи шпорцевая лягушка может впадать в спячку, при этом азотистый обмен у нее переключается с аммонотелии на уреотелию [10].

У ряда изученных видов переход в солоноводную среду ведет к активации цикла мочевины. Обнаружено, что концентрация мочевины в крови *X. laevis* и скорость ее экскреции заметно увеличиваются при содержании этих животных в гипертоническом солевом растворе [12].

Яркий пример зависимости типа азотистой экскреции у амфибий от количества воды можно наблюдать у бесхвостых сумчатых лягушек *Gastrathea riobambae*, у которых превалирующим является уреотелизм. Свободноживущие головастики *G. riobambae* выделяют большей частью мочевины. Мочевину экскрецируют даже эмбрионы из сумки этой лягушки. При этом активность аргиназы высока и в эмбрионах, и у головастиков. Таким образом, уреотелизм личинок *G. riobambae* является адаптацией к продленной инкубации в сумке матери, к развитию в ограниченном количестве воды [9].

В природе встречается еще и явление так называемого "второго метаморфоза", когда при наступлении половозрелости амфибии возвращаются к водному образу жизни. Этот процесс, сопровождающийся увеличением количества выделяемого аммиака и приобретением ряда личиночных морфологических характеристик, наблюдается, например, у тритонов *Triturus viridescens* [13].

Интересно, что амфибии до метаморфоза являются аммонотелическими организмами, у них представлены все ферменты орнитинового цикла, которые не функционируют как единый механизм. Лишь после метаморфоза ферменты биосинтеза аргинина и аргиназа печени функционируют как единый механизм орнитинового цикла мочевинообразования. Таким образом, до метаморфоза синтезированный аргинин недоступен для существующей аргиназы, а после метаморфоза тот же аргинин атакуется аргиназой. На основании этих фактов многие авторы заключили, что суть формирования уреотелизма при переходе амфибий от обитания в водной среде к наземному образу жизни заключается в изменении компартиментализации аргиназы или модификации фермента, в результате чего эндогенно синтезированный аргинин становится доступным для аргиназы [8, 11, 13]. Однако эти точки зрения были пересмотрены после того, как было выдвинуто и обосновано положение о существовании в природе двух различных форм аргиназы: одна – уреотелическая аргиназа, присутствующая в печени уреотелических животных и участвующая в механизме нейтрализации аммиака орнитинным циклом биосинтеза мочевины; другая – неуреотелическая, не связанная с механизмом нейтрализации аммиака, представленная во всех организмах и тканях, вне зависимости от типа азотистого катаболизма и имеющая иные функции в метаболизме клеток (обеспечение включения аргинина в биосинтез пролина и полиаминов, лимитирование процессов биосинтеза однозамещенных гуанидиновых соединений, каковым является креатин, контролирование биосинтеза гистонов и др.) [6,7]. Очевидно, неуреотелическая аргиназа контролирует и биосинтез NO из аргинина.

В свете положения о существовании двух различных форм аргиназ было дано новое объяснение механизму формирования уреотелизма в процессе эволюции и онтогенетического развития, согласно которому в этом механизме решающим является индукция уреотелической аргиназы, а не модификация существующей до этого неуреотелической аргиназы [6,7]. Вскоре было показано, что при индивидуальном развитии, в особенности при метаморфозе насекомых и амфибий, происходят глубокие изменения в изоэнзимном спектре аргиназ, и на определенном этапе развития индуцируется уреотелическая аргиназа, которая, интегрируясь с ферментами биосинтеза аргинина, обуславливает формирование орнитинового цикла мочевинообразования. В частности, показано, что у лягушек *Rana ridibunda* до метаморфоза в печени обнаруживаются разделяемые по молекулярной массе 3 изофермента аргиназы, II изофермент репрессируется на ранних стадиях развития, далее в течение метаморфоза репрессируется III изофермент и резко индуцируется I изофермент. При дальнейшем дополнительном фракционировании последнего изофермента на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой проявляются три активные фракции (изоферменты IA, IB, IC), из которых при метаморфозе индуцируются изоферменты IB и IC, а IA остается без изменений. Таким образом, переход при метаморфозе личинок в зрелые особи, т. е. при переходе от аммонотелизма к уреотелизму, индуцируются IC, и особенно IB изофермент аргиназы, который по многим параметрам (молекулярная масса, K_m , цитоплазматическая локализация, нетиоловый характер, особенности кислотной инактивации и реактивации и др.) идентичен уреотелической аргиназе печени уреотелических животных [1-5].

Таким образом, в течение онтогенеза лягушек проявляются 3 изофермента аргиназы, из которых II исчезает на ранних стадиях развития личинок, III репрессируется в период метаморфоза, IC и особенно IB резко индуцируются в течение метаморфоза и сохраняются на высоком уровне у зрелых особей. IA при метаморфозе сохраняется на неизменном уровне. Очевидно, под влиянием изменения внешних факторов через механизмы индукции и репрессии регулируется очередность реализации генной информации о биосинтезе различных белков, в том числе изоферментов, что является сутью молекулярных основ адаптации организмов к измененным условиям внешней среды. Именно индукция уреотелической аргиназы печени лягушек при переходе амфибий из водной среды обитания на сушу обуславливает формирование уреотелизма, при этом уреотелическая аргиназа интегрируется с ферментами биосинтеза аргинина, образуя орнитин-новый цикл мочевинообразования.

Репрессированные до метаморфоза изоферменты II и III, а также сохранившийся после метаморфоза изофермент IA являются неуреотелическими и в зависимости от потребностей организма подвергаются репрессии или индукции, выполняя, как мы уже отмечали, определенные функции, не связанные с уреотелизмом (биосинтез из аргинина глутамата, пролина и полиаминов, лимитирование биосинтеза NO, гистонов, гуанидиновых соединений и др.).

В настоящее время обнаружены и клонированы ген уреотелической аргиназы и три гена неуреотелической аргиназы амфибии *X. laevis*, причем информационная РНК уреотелической аргиназы содержится в печени в следовых количествах, а после метаморфоза ее количество резко возрастает [15,14].

Из вышеизложенного следует, что формирование уреотелизма в течение эволюции и онтогенеза как адаптивного механизма нейтрализации аммиака при переходе организмов из водной среды обитания в наземную осуществляется сложным механизмом, существенным в котором является индукция уреотелической аргиназы на фоне репрессии неуреотелических аргиназ. Следовательно, изменение изоферментного спектра аргиназ в ходе онтогенеза может быть характерным для каждого вида лягушек и отражать адаптивные возможности животного.

Целью данной серии исследований являлось изучение особенностей изоэнзимного спектра аргиназы печени ряда представителей амфибий, распространенных на территории Армении, а также изыскание возможности использования полученных данных в качестве дополнительных характеристик для классификации отдельных подвидов земноводных. Известно, что зеленые лягушки, ранее разделяемые на "озерных" и "прудовых", в действительности представляют собой сложный комплекс, состоящий из трех форм: озерной – *R. ridibunda*, более мелкой *R. lessonae* и *R. esculenta*, являющейся гибридом двух первых, и специалисты нередко затрудняются в их определении.

Материал и методы. Объектом исследований служили 5 видов лягушек, распространенных в Армении.

Rana ridibunda, обитающие:

1. в районе озера Айгерлич и реки Мецамор, 856 м. над ур. м., полупустынная зона;
2. в Арташатском районе, 851 м над ур. м., пустынная зона;
3. в окрестностях села Анкаван, 1937 м, высокогорная зона;

4. в окрестностях села Ошакан, 1000 м, горнолесная зона;
5. в районе озера Севан, 2000 м, горнопустынная зона;
6. в районе горы Арагац, 2500 м, высокогорная зона;

Rana macrocnemis, обитающие:

1. в Анкаване 1937 м, высокогорная зона;
2. в Дилижанском районе, Парзлич, 740 м, горнолесная зона.

Hyla arborea schelkovnikovi, *Hyla savignyi*, обитающие в Наирийском районе, село Просян -1100 м, полупустынная зона;

Pelobates syriacus, обитающие в Ехегнадзорском районе, село Ринд, 1400 м, полупустынная зона;

Ферментативную активность определяли по ранее описанному методу [2]. Фракционирование экстрактов печени проводили методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200 (Pharmacia, Upsala, Sweden) и ионообменной хроматографией на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (колонка 1.5х 36 см, уравновешенная 0.005 М трис-НСl буфером). Ступенчатую элюцию проводили растворами KCl в том же буфере при повышении молярности от 0 до 0.3 М. Скорость элюции 30 мл/час, объем фракции 5 мл.

Результаты и обсуждение. Полученные нами результаты исследований по определению аргиназной активности у взрослых форм 5 видов (11 групп) лягушек, обитающих в различных географических зонах Армении, суммированы в табл. 1.

Самая высокая активность фермента нами была отмечена у *H. arborea schelkovnikovi* и *H. savignyi* (43000 и 44250 мкмоль/г соответственно). Несколько ниже активность фермента у *R. macrocnemis* (обе группы) – 32000-39000 мкмоль/г. Активность аргиназы печени у *R. ridibunda* (все 6 групп) и у *P. syriacus* почти вдвое ниже, чем у вышеуказанных видов (20800 и 24400 мкмоль/г).

Таким образом, не обнаруживается корреляции между общей активностью аргиназы печени и выживаемостью того или иного вида исследованных лягушек. В этом отношении является наглядным факт очень низкой активности фермента как у экологически пластичного вида *R. ridibunda*, так и у *P. syriacus*, имеющей узкую приспособляемость.

Можно было предположить, что печень организмов, адаптированных к различным условиям среды, должна содержать качественно различные наборы изоферментов. В связи с этим мы задались целью выяснить, играют ли условия обитания животных роль в индукции отдельных изоферментов и какое отражение находят эти процессы в механизме становления уреотелизма.

С этой целью экстракт печени лягушек пропускали через колонки с сефадексом G-200, далее выявленную активную фракцию фермента (изофермент I) пропускали через колонки с ДЭАЭ-целлюлозой. На рис. 1-13 приведены результаты гель-фильтрации экстрактов печени. Результаты исследования четко показали, что при гель-фильтрации экстракта печени взрослых лягушек *R. ridibunda* из различных местообитаний, *R. macrocnemis* и *H. arborea schelkovnikovi* аргиназа фильтруется в виде одного пика, а у *H. savignyi* и *P. syriacus* – в виде двух пиков. Таким образом, у трех видов лягушек в печени проявляется одна высокомолекулярная аргиназа, а у двух видов, кроме того, проявляется и вторая (низкомолекулярная) аргиназа.

Указанные различия в изоэнзимном спектре аргиназы являются весьма существенными биохимическими особенностями. Примечательно, что *H. arborea schelkovnikovi* и *H. savignyi* различаются по указанным характеристикам, что является существенным аргументом в пользу их различной видовой принадлежности.

В последующих экспериментах дополнительному фракционированию на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой подвергались только I пики аргиназной активности экстрактов печени всех изученных групп лягушек, выделенных методом гель-фильтрации. Данные представлены на соответствующих кривых (рис. 1-13) и суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Изоферментный состав аргиназы печени амфибий

Вид	Группа	Порядок убывания активности изоферментов	Активность Е
<i>Rana ridibunda</i>	I	IB > IC > IA	23508
	II	IB > IA > IC	24400
	III	IB > IA > IC	20800
	IV	IB > IA > IC	22300
	V	IB > IA > IC	20800
	VI	IB > IC > IA	22000
<i>Rana macrocnemis</i>	I	IB > IC > IA	32000
	II	IB > IC > IA	39000
<i>Hyla arborea schelkovnikovi</i>		IB > IA > IC	43000
<i>Hyla savignyi</i>		IC > IB > IA	44250
<i>Pelobates syriacus</i>		IA > IB > IC	22500

Как видно из табл. 1, для *R. ridibunda* (все 6 групп), *R. macrocnemis* (обе группы) и *H. arborea schelkovnikovi* характерна резкая выраженность изофермента IB, причем порядок убывания активности у трех изоферментов следующий: *R. ridibunda* (I и VI группы) IB > IC > IA; *R. ridibunda* (II, III, IV, V) IB > IA > IC; *R. macrocnemis* (I и II группы) IB > IC > IA; *H. arborea schelkovnikovi* IB > IA > IC.

Обращает на себя внимание факт резкой индукции изофермента IA и IC у двух последних видов (*H. savignyi* и *P. syriacus*), где порядок убывания активности изоферментов следующий: IC > IB > IA и IA > IB > IC.

Таким образом, изоферментный состав аргиназы печени различен не только для различных видов лягушек, но и для представителей одного и того же вида в зависимости от условий местообитания.

Обнаруженные нами различия в изоферментном спектре аргиназы печени отдельных представителей бесхвостых амфибий отражают существенные различия в регуляции биохимических процессов. Очевидно, эти различия играют определенную роль в адаптации организмов к определенной среде обитания. Без сомнения, одним из очевидных способов адаптации к определенным условиям жизни на молекулярном уровне является изменение степени экспрессии изоферментов способами их индукции или репрессии.

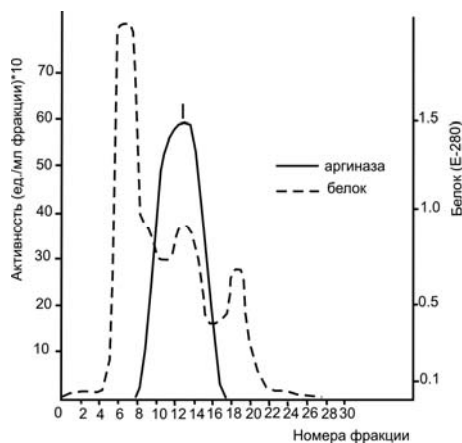


Рис. 1. Фракционирование экстракта печени *R. ridibunda* (сефадекс G-200), Мецамор.

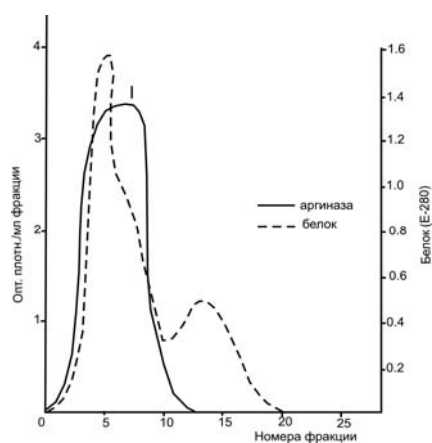


Рис. 2. Фракционирование экстракта печени *R. macrocnemis* (сефадекс G-200), Анкаван.

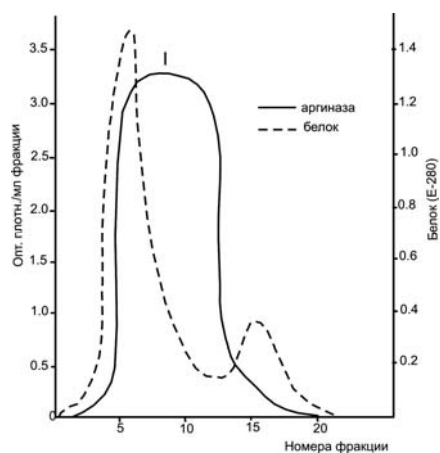


Рис. 3. Фракционирование экстракта печени *H. arborea schelkovnikovi* (сефадекс G-200), Анкаван.

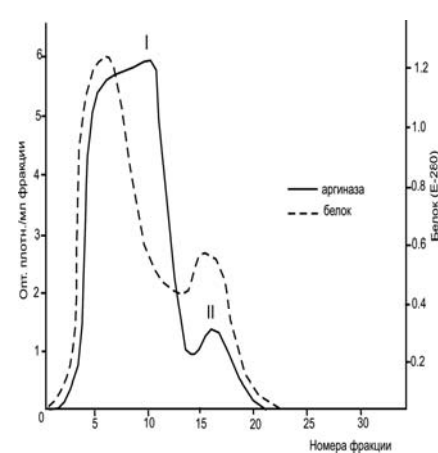


Рис. 4. Фракционирование экстракта печени *H. savignyi* (сефадекс G-200), с. Прошьян

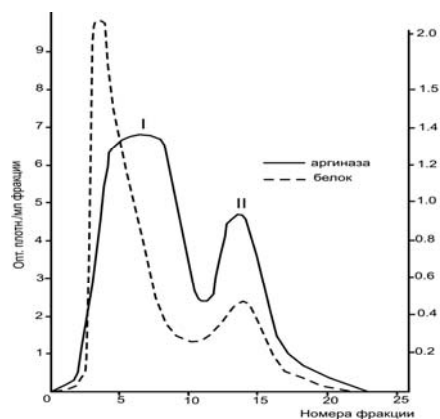


Рис. 5. Фракционирование экстракта печени *P. syriacus* (сефадекс G-200), с. Ринд.

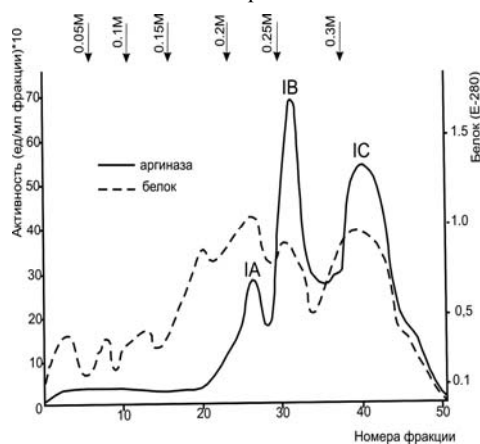


Рис. 6. Фракционирование экстракта печени *R. ridibunda*, Мецамор, I группа, (ДЭАЭ целлюлоза).

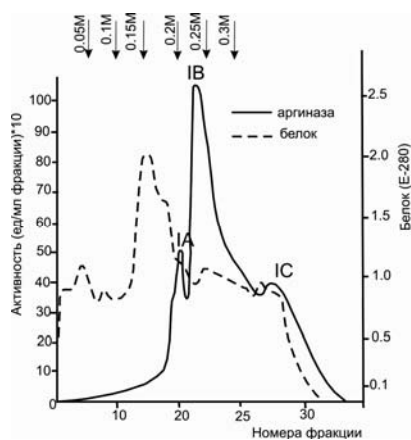


Рис. 7. Фракционирование экстракта печени *R. ridibunda*, Арташат, II группа (ДЭАЭ целлюлоза).

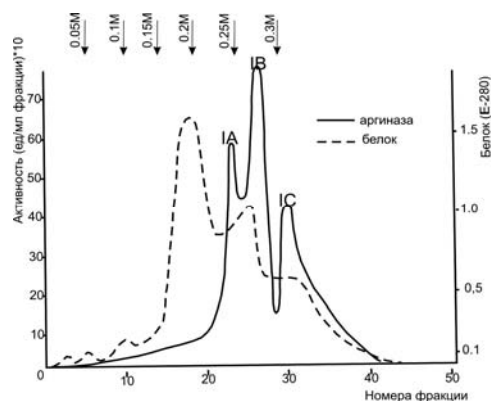


Рис. 8. Фракционирование экстракта печени *R. ridibunda*, Анкаван, III группа, (ДЭАЭ целлюлоза).

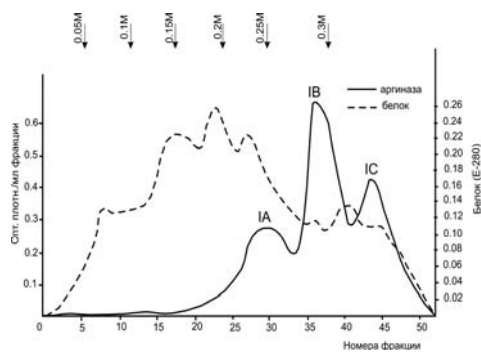


Рис. 9. Фракционирование экстракта печени *R. macrocnemis*, Анкаван, I группа, (ДЭАЭ целлюлоза).

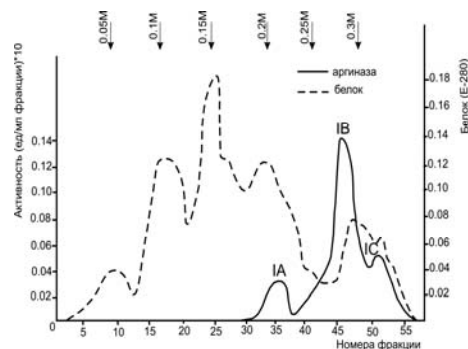


Рис. 10. Фракционирование экстракта печени *R. macrocnemis*, с. Прошян, II группа, (ДЭАЭ целлюлоза).

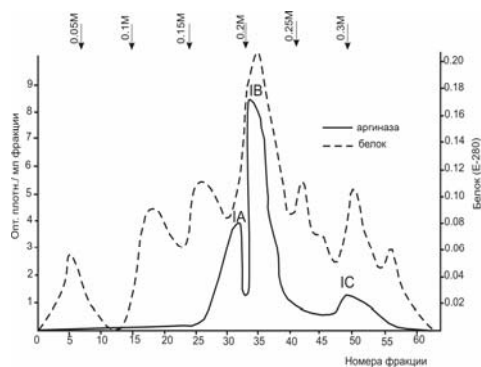


Рис. 11. Фракционирование экстракта печени *H. arborea schelkovnikovi*, Анкаван, (ДЭАЭ целлюлоза).

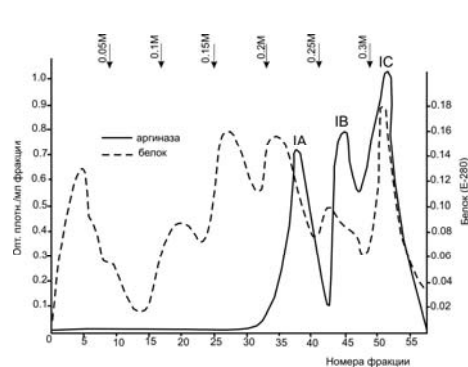


Рис. 12. Фракционирование экстракта печени *H. savignyi*, с. Прошян, (ДЭАЭ целлюлоза).

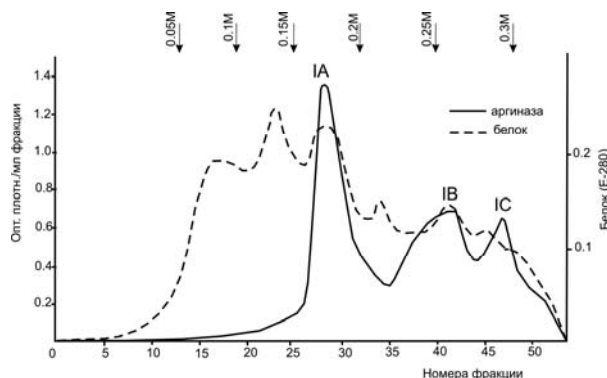


Рис. 13. Фракционирование экстракта печени *P. syriacus*, с. Ринд (ДЭАЭ целлюлоза).

Результаты проведенных исследований позволяют также внести ясность в некоторые спорные вопросы по определению отдельных подвидов животных внутри вида.

В природе распространены смешанные популяции, составленные различными подвидами лягушек в разных количественных соотношениях, что вызывает затруднения для специалистов в их определении. Известно, что только при определенном соотношении этих подвидов достигается оптимальная жизнедеятельность и плодовитость популяции, поскольку для лягушек характерен "групповой эффект" — снижение животными уровня метаболизма в группе по сравнению с находящейся в таких же условиях одиночной особью. Это явление способствует экономному расходованию резервных веществ, что увеличивает возможность выживания.

Согласно нашим данным, у трех групп *R. ridibunda*, отловленных в различных районах Армении, резко выражен изофермент IB, который, как уже отмечалось, играет решающую роль в механизме становления уреотелизма. Степень активирования двух других изоферментов различна, в зависимости от местообитания, так, у *R. ridibunda* I и VI групп $IC > IA$, а у II и III, IV и V групп — $IA > IC$.

Вероятно, I и VI группы *R. ridibunda* определенным образом отличаются от четырех других групп того же вида, хотя при определении их по Терентьеву, классификация которого основана на внешних морфологических характеристиках животных, никаких различий не обнаружено. Возможно, биологические особенности данной популяции *R. ridibunda* играют определенную роль в обеспечении приспособления животных к конкретным условиям среды.

Результаты исследований изоферментных спектров позволили также четко различить *H. arborea schelkovnikovi* и *H. savignyi*, которые по морфологическим характеристикам трудно различимы. Это созвучно данным исследований биоакустических особенностей указанных видов.

Таким образом, изоферментный спектр аргиназы печени механизмами индукции и репрессии меняется на отдельных этапах онтогенетического развития амфибий, а также в зависимости от условий среды, как в количественном, так и в качественном отношении, что в свою очередь обеспечивает включение или выключение определенных метаболических пу-

тей, различные этапы которых катализируются теми или иными изоферментами аргиназы. Эти изменения отражают существенные различия в регуляции биохимических процессов, что, очевидно, проявляется в возможности выживания и развития в определенной среде и может рассматриваться как проявление "биохимической адаптации" к определенным условиям среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арируни Н.А., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 54, 1-2, с. 3-8, 2002.
2. Барсегян Э.Х., Арируни Н.А., Давтян М. А. Биолог. журн. Армении, 54, 1-2, с. 9-13, 2002.
3. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 30, 6, с. 12-20, 1977.
4. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 30, 12, с. 73-76, 1977.
5. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М. А. Биолог. журн. Армении, 32, 12, с. 1176-1178, 1979.
6. Давтян М.А. Вопр. биохимии мозга, 3, 1968.
7. Давтян М.А., Буниятян Г.Х, Биохимия 5, с. 412-417, 1970.
8. Исаченков В., Нестайко К. Эволюция вегетативных функций. Изд. Наука, Л., 1971.
9. Alcocer J., Santacruz X. Comp. Biochem. Physiol. 101, 2, 229-231, 1992.
10. Balinsky B., Baldwin D. J. Exp. Biol., 38, 695-705, 1961.
11. Brown Y. J. Biol. Chem. 234, 7, 17-80, 1959.
12. Mc Beau A, Goldsfeiu S. Science, 157, 931-932, 1967.
13. Palacios R., Huifron C. Biochem J., 114, 3, 449-454, 1969.
14. Patterton D., Shi Y. J. Biol. Chem. 269, 41 2528-2534, 1994.
15. Xu. H., Baker B., Tat Y. Development and hormonal regulation of the *Xenopus* liver-type arginase gene. 211, 3, 891-898, 1993.

Поступила 08.10.2008.