ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆԻ ԳԻՏԱԿԱՆ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЕРЕВАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Քիմիա և կենսաբանություն 3, 2012 Химия и биология

Կենսաբանություն

УДК 577:155.34.615.5

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏԻ ԵՎ *RANA RIDIBUNDA* ԳՈՐՏԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԷԴՏԱ-ՈՎ ԱՊԱԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. Ս. ՇԱՄԻՐՅԱՆ, Թ. Ն. ՍԻՄՈՆՅԱՆ*, Է. Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ

ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոն, Հայաստան

Բանալի բառեր. դարձելի ապաակտիվացում, իզոֆերմենտներ, ուրեոտելիկ արգինազ:

ԵՊՀ-ի կենսաքիմիայի ամբիոնի կողմից վերջին տարիներին կատարվում են խորացված ուսումնասիրություններ *Rana ridibunda* գորտի և առնետի լյարդի ուրեոթելիկ և ոչ ուրեոթելիկ արգինազների կառուցվածքային առանձնահատկությունների վերաբերյալ: Այս հարցում արժեքավոր տեղեկություններ կարելի է ստանալ ֆերմենտի տարբեր ձևերով դարձելի ապաակտիվացման գործընթացը հետազոտելիս (թթվային պայմանների, խելատային նյութերի ազդեցությամբ): Ապաակտիվացման և վերակտիվացման նշված մեխանիզմների հետազոտություններն ընդգրկում են նաև Mn իոնների մասնակցության հարցը:

Կենսաքիմիայի ամբիոնում կատարված աշխատանքները ցույց են տվել, որ գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը զգալիորեն ակտիվանում է ոչ միայն Mn այլ նաև Co և Ni իոններով, սակայն նրա իրական կոֆակտորը հանդիսանում է Mn^{2+}-ը, որը մտնում է սպիտակուցի կազմի մեջ, ինչի մասին վկայում են ԷՊՌ-ի սպեկտրների տվյալները, որոնց հետազոտությունները ցույց են տվել, որ գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը պարունակում է ամենաքիչը 2 տիպի Mn իոններ, որոնք տարբերվում են ֆերմենտի մոլեկուլում իոնի սպիտակուցային շրջապատի առանձնահատկություններով: Ընդ որում, կապող հատվածների թիվը մի տիպի Mn իոնների համար մոտ 2 անգամ ավելի է մյուս տիպի իոնների հետ կապող հատվածների թվից [1]:

Հայտնի է, որ արգինազի մոլեկուլի օլիգոմերային կառուցվածքի պահպանման և կատալիտիկ հատկությունների դրսևորման համար անհրաժեշտ են որոշակի երկվալենտ կատիոններ: Որոշ խելատային միացություններ մասնավորապես՝ էթիլենդիամին տետրաացետատը (ԷԴՏԱ), կապելով այդ իոնները ոչ մրցակցային ձևով արգելակում են ֆերմենտի ակտիվությունը: Արգինազի ակտիվության անկումը՝ ԷԴՏԱ-ի ազդեցությամբ, նկարագրվել է

* E-mail: tamara.simonyan@gmail.com

մի շարք հետազոտողների կողմից [2, 3]: Օրինակ՝ առնետների կաթնագեղձի արգինազը լիովին արգելակվում է pH 6-ի պայմաններում, ԷԴՏԱ-ի 5 *մմոլ* կոնցենտրացիայի դեպքում, իսկ հետագայում ֆերմենտի ակտիվությունը վերականգնվում է Mn իոնների ավելացման պայմաններում [4]:

Մարդու էրիթրոցիտների մաքրված արգինազը, որը թեև պահպանում է ֆերմենտային ակտիվությունը թորած ջրում դիալիզից հետո, կորցնում է այն՝ ԷԴՏԱ-ի ավելացումից հետո [5]: Ցուլի լյարդի արգինազը նույնպես ապաակտիվանում է ԷԴՏԱ-ով՝ Mn-ը կապելու ճանապարհով: Ըստ հետազոտողների մեծ մասի ապաակտիվացումն ԷԴՏԱ-ի ազդեցությամբ, ուղեկցվում է ֆերմենտի ենթամիավորների տրոհմամբ [6]:

Հետազոտության մեթոդները: Հետազոտվել են լճային գորտը (*Rana ridibunda*) և 150–200 *գ* քաշ ունեցող սպիտակ առնետը: Փորձերի ընթացքում օգտագործվել են 10%-ոց լյարդի հոմոգենատներ պատրաստված 0,005 *M* տրիս HCl բուֆերում pH 7,4:

Արգինազային ակտիվությունը որոշվել է Ռատների մեթոդով [7]: Միզանյութի քանակը որոշվել է Արչիբալդի եղանակով, որը բարեփոխվել է Մուրի և Կաուֆմանի կողմից [8]: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտվել է առաջացած միզանյութի *մկմ*-ով՝ հաշված 1 *գ* թարմ հյուսվածքի վրա: Արգինազի ապաակտիվացումը կատարվել է ԷԴՏԱ-ի ազդեցությամբ, որի վերջնական կոնցենտրացիան եղել է $5 \cdot 10^{-2}$ *մոլ*:

Հետազոտությունների արդյունքները և քննարկումը: Կատարվել է ֆերմենտի ապաակտիվացումն ԷԴՏԱ-ով միջավայրի տարբեր pH-ի արժեքների պայմաններում (pH 7,4; 8,6; 9,0; 9,5): Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են աղյ. 1 և 2-ում:

Աղյուսակ 1

Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը R. ridibunda գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա (n=6)

Արգինազի ակտիվությունը, *մկմոլ/գ*				
	միջավայրի pH-ը			
նմուշը	7,4	8,6	9,0	9,5
ելակետային ակտիվությունը	29380	29380	29380	29380
ապաակտիվացված արգինազը (120')	2056	2651	1805	1920
ապաակտիվացման չափը (%)	93	91	94	94

Ինչպես երևում է աղյ. 1-ից, միջավայրի pH-ը 7,4–9,5 սահմաններում չի ազդում *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա: Բոլոր հետազոտված pH-ների պայմաններում գորտի լյարդի արգինազը 2 *ժ* ընթացքում ապաակտիվացել է գործնականորեն հավասար չափով (91–94%):

Գրականությունից հայտնի է, որ ԷԴՏԱ-ի ազդեցության տակ տարբեր օբյեկտներից անջատված արգինազներն ենթարկվում են տրոհման: Օրինակ՝ մարդու թոքերի, լյարդի և երիկամների արգինազները (մոլ. զանգվածը՝ 120000 *Դալտոն*) ԷԴՏԱ-ի ազդեցության տակ բաժանվում է 4 մոնոմերների: Այս տվյալները խոսում են այն մասին, որ Mn իոններն անհրաժեշտ են կառուցվածքի պահպանման համար: Սակայն հորթի և առնետի լյարդի արգինազների վերաբերյալ կան տվյալներ, որի համաձայն ԷԴՏԱ-ի ազդեցությամբ կատարվում է ֆերմենտի ապաակտիվացում, ինչը հայտնաբերված

է և մեր կողմից, սակայն մոլեկուլի տրոհում չի հայտնաբերվում [9]: Այս երևույթը խոսում է նշված կենդանիների մոտ արգինազի մոլեկուլում Mn իոնի առանձնահատուկ դասավորության մասին:

Աղյուսակ 2

Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը սպիտակ առնետի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա (n=4)

Միջավայրի pH-ը								
ապաակտիվացման տևողությունը, *րոպե*	7,4	ապակ., %	8,6	ապակ., %	9,0	ապակ., %	9,5	ապակ., %
ելակետային ակտիվությունը	1699	–	1699	–	1699	–	1699	–
60'	981	42,3	1461	14	1584	7	1600	5,8
120'	673	60,4	1355	20,4	1527	10	1605	5,5
240'	308	81,9	956	43,7	1502	11,6	1453	14,5

Ինչպես երևում է աղյ. 2-ի տվյալներից, միջավայրի pH-ը 7,4–9,5 պայմաններում զգալիորեն ազդում է ԷԴՏԱ-ով առնետի լյարդի ապաակտիվացման գործընթացի վրա: Այս դեպքում 4 *ժ* հետո pH 7,4-ի պայմաններում ապաակտիվացման տոկոսը կազմում է մոտ 82%, pH-ը 8,6-ի դեպքում 44%: Ապաակտիվացման գործընթացը խիստ դանդաղում է pH 9,0 և pH 9,5 դեպքում՝ հասնելով 10–15%:

Չնայած նրան, որ գորտի և առնետի լյարդի արգինազներն ուրեոթելիկ իզոֆերմենտներ են, սակայն ապակտիվացման գործընթացի ուսումնասիրման ընթացքում նկատելի են որոշակի տարբերություններ: Եթե *R. ridibunda* գորտի դեպքում միջավայրի pH-ը 7,4–9,5 սահմաններում չի ազդում ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա ապա առնետի լյարդի արգինազը ապաակտիվանում է միայն pH 7,4-ի պայմաններում:

Ստացած տվյալները կարելի է բացատրել այն փաստով, որ ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման համար օպտիմալ են համարվում միջավայրի չեզոք կամ թույլ հիմնային pH-ը, քանի որ հիմնային միջավայրում ԷԴՏԱ-ի մետաղի հետ կոմպլեքսի առաջացումը կատարվում է ոչ ամբողջությամբ մետաղների հիդրոքսիդների առաջացման պատճառով: Միջավայրի թթվայնությունը բարձրանում է pH-ի թթվային արժեքների պայմաններում, ԷԴՏԱ-ից սեփական պրոտոնների առաջացման արդյունքում [2]: Հաշվի առնելով վերը նշվածը, հետագա փորձերը կատարվել են pH 7,4-ի պայմաններում:

Փորձերի II փուլում կատարվել է հետազոտվող ֆերմենտի ապաակտիվացումը 2 ջերմաստիճանային ռեժիմների պայմաններում (0^0C; 20^0C): Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են աղյ. 3 և 4-ում:

Ինչպես երևում է աղյուսակ 3-ի տվյալներից, *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացն ունի արտահայտված ջերմաստիճանային կախում: 20^0C-ի պայմաններում հետազոտվող ֆերմենտը 2 *ժ* հետո կտրուկ ապաակտիվացել է 90%-ով, իսկ 0^0C պայմաններում, նույն ժամանակահատվածում, ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացում չի կատարվել: Նույնիսկ 22 *ժ* հետո, 0^0C պայմաններում, ֆերմենտի ակտիվությունն ընկել է միայն 10%-ով:

Աղյուսակ 3

Ջերմաստիճանի ազդեցությունը R. ridibunda գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա (n=6)

Նմուշը	Արգինազի ակտիվությունը, *մկմոլ/գ*			
	0^0C	ապակ., %	20^0C	ապակ., %
ելակետային ակտիվությունը	30890	–	30890	–
2 *ժ* հետո	30000	–	2780	90
22 *ժ* հետո	27800	10	–	–

Աղյուսակ 4

Ջերմաստիճանի ազդեցությունը սպիտակ առնետի լյարդի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա (n=4)

Նմուշը	0^0C	Ապակ., %	20^0C	Ապակ., %
ելակետային ակտիվությունը	1699	–	1699	–
ապաակտիվացման ժամանակը 30'	1559	8,3	829	51
60'	1600	6,8	731	57
120'	1436	15,5	398	76,6
180'	1401	17,1	353	79
22 *ժ*	1383	18,6	0	0

Ինչ վերաբերվում է սպիտակ առնետի լյարդի արգինազին, 20^0C-ի պայմաններում հետազոտվող ֆերմենտն 30 *րոպե* անց կտրուկ ապաակտիվանում է 51%-ով, 2 *ժ* հետո 76,6%-ով, իսկ 3 *ժ* հետո 79%-ով: Համեմատելով այս տվյալները գորտի լյարդի արգինազի տվյալների հետ կարելի է նշել, որ այս դեպքում 3 *ժ* հետո ֆերմենտն ապաակտիվանում է 79%-ով, իսկ *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազան 2 *ժ* հետո ապաակտիվանում է 90%-ով: 0^0C պայմաններում ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացումը 22 *ժ* հետո կազմում է 18,6%, իսկ գորտի լյարդի արգինազի դեպքում ընդամենը 10%-ով, ինչը 2 անգամ ավելի ցածր է: Դեհլիգը և իր աշխատակիցները նույնպես նկարագրել են ցածր ջերմաստիճանի արգելակող ազդեցությունը առողջ մարդու թոքերի արգինազի ԷԴՏԱ-ով ապաակտիվացման գործընթացի վրա [5]:

Այսպիսով՝ սպիտակ առնետի և գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազների ապաակտիվացման մեխանիզմների տարբերությունները պայմանավորված են իզոֆունկցիոնալ սպիտակուցների առանձնահատկություններով:

Ստացվել է 15.05.2012

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. **Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Месропян М.Б.** Изоферменты аргиназы печени лягушек *Rana Ridbunda*. // Биол. ж. Армении, 1979, т. 32, № 12, с. 1176–1178.
2. **Бабков А.В.** Методы белковой химии. М.: Высшая школа, 1978.
3. **Baranzyk-Kuzma A., Scrzypec-Osiecka I., Zaleyska M., Porembska Z.** Purification and Some Properties of Human Heart Arginase. // Acta Bochem. Polon., 1980, v. 27, № 3–4, p. 181–189.
4. **Dahlig E., Porembska Z.** Reactivation of the EDTA-treated Arginase from Rat and Calf Liver. // Acta Biochim. Polon., 1977, v. 24, № 3, p. 187–196.

5. **Dahlig E., Porembska Z., Mochnachka I.** Purificaton and Some Properties of Arginase from Human Lung. // Acta Biochim. Polon., 1975, v. 22, № 1, p. 77–85.
6. **Porembska Z.** Different Species of Arginase in Animal Tissues. // Enzyme, 1973, v. 15, p.198–209.
7. **Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А.** Изучение изоферментного спектра аргиназы печени лягушки *Rana Ridbunda* в процессе онтогенеза. // Биол. ж. Армении, 1977, т. 30, № 6, с. 12–20.
8. **Moor R.B., Kauffman N.J.** Simultaneous Determination of Citrulline and Urea Using Diacetilmonooxine. // Anal. Biochem., 1970, v. 33, p. 263–272.
9. **Przylecki St.J., Opienska J., Giedroyc H.** La Degradation de l'Acide Urique Cher les Etres Vivants. // Arch. Int. Physiol. Biochem., 1922, v. 20, p. 207–217.

А. С. ШАМИРЯН, Т. Н. СИМОНЯН, Э. Х. БАРСЕГЯН

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ИНАКТИВИРОВАНИЯ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС И ЛЯГУШЕК *RANA RIDIBUNDA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭДТА

Резюме

Показано, что аргиназа печени лягушек под воздействием ЭДТА при изменении pH в интервале 7,4–9,5 инактивируется одинаково, в отличие от аргиназы крыс, которая инактивируется только при pH 7,4.

В обоих случаях показан также тормозящий эффект низких температур в процессе инактивирования. Выявленые различия в процессе инактивирования аргиназы печени лягушек и крыс, возможно, обусловлены межвидовыми различиями изофункциональных белков.

A. S. SHAMIRIAN, T. N. SIMONYAN, E. Kh. BARSEGHYAN

STUDY OF INACTIVATION PROCESS OF RAT AND *RANA RIDIBUNDA* FROG LIVER ARGINASE UNDER THE INFLUENCE OF EDTA

Summary

The dependence of etilendiamintetraacetat (EDTA) effect on the pH medium and temperature for white rat and *Rana Ridibunda* frog ureotelic arginases was studied.

It was shown that arginase of the liver of frogs under the influence of EDTA was inactivated at pH 7,4–9,5 unlike the rat's arginase, which is inactivated at same conditions accurately at pH 7,4 only.

The inhibitory effect of low temperatures in the process of inactivation in both cases was shown also. Significant differences in the process of inactivation in both cases which is conditioned by interspecific differences of isofunctional proteins were revealed.