Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարականևտեսականհոդվածներ•Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Հայաստանիկենսաբ. հանդես,1 (71), 2019

ՃԱԳԱՐԻ ՈՐՈՇ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ D-ԱՄԻՆԱԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԵԼԱՆՅՈՒԹԱՅԻՆ ՅՈՒՐԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Հ.Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Է.Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Ա.Հ. ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ

ԵՊՀ, կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայիամբիոն
hkarapetyan@ysu.am

Ցույց է տրված, որ D-ամինաթթվային օքսիդազը ճագարի տարբեր օրգաններում ունի լայն ելանյութային յուրահատկություն: Հետազոտված 7 D-ամինաթթուներից արտահայտված ուժգնությամբ դեզամինացվել են D-ալանինը, D-թիրոզինը և D-արգինինը: Ուսումնասիրվել է ծանր մետաղների իոնների (Ni^{2+},Fe^{2+},Cu^{2+} , Zn^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+}) ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա ճագարի ուղեղում, լյարդում և երիկամներում:

D-ամինաթթվային օքսիդազ– D-ամինաթթու–ծանր մետաղների իոններ

В некоторых органах кролика выявлена D-аминокислотная оксидаза. Показано, что фермент имеет широкую субстратную специфичность. Из исследованных 7-ми D-аминокислот более интенсивно дезаминировались D-аланин, D-тирозин и D-аргинин. Изучено влияние ряда ионов тяжелых металлов (Ni^{2+},Fe^{2+},Cu^{2+} , Zn^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+}) на активность D-аминокислотной оксидазы печени, почек и мозга.

D-аминокислотная оксидаза –D-аминокислота – ионы тяжелых металлов

The D-amino acid oxidase was detected in a number of rabbit organs. It has been shown that the enzyme has broad substrate specificity. Out of 7 D-amino acids studied, the D-alanine, D-tyrosine and D-arginine amino acids were more intensively deaminated. The effects of a number of heavy metal ions (Ni^{2+},Fe^{2+},Cu^{2+} , Zn^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+}) on the D-amino acid oxidase activity of the liver, kidneys and brain were studied.

D-amino acid oxidase – D-amino acid – heavy metal ions

Ամինաթթուների փոխանակության ընդհանուր օրինաչափություններիցէ նրանց օքսիդային դեզամինացումը՝ L- և D-ամինաթթվային օքսիդազների մասնակցությամբ: D-ամինաթթվային օքսիդազը լայնորեն տարածված է բնության մեջ՝ միկրոօրգանիզմներից մինչև կաթնասուններ, սակայն նրանց ֆիզիոլոգիական դերը դեռևս ամբողջությամբ պարզաբանված չէ:

Հայտնի է D-ամինաթթվային օքսիդազի անմիջական մասնակցությունը միկրոօրգանիզմների նյութափոխանակության, ինչպես նաև կաթնասունների էնդոգեն D-ամինաթթուների կուտակման, նյարդային համակարգի աշխատանքի կարգավորման և ծերացման գործընթացներում [3,4,7]: Մի շարք հիվանդությունների դեպքում նյարդային հյուսվածքում, արյան շիճուկում, ողնուղեղային հեղուկում նկարագրված են ինչպես D-ամինաթթուների քանակության, այնպես էլ նրանց օքսիդազների ակտիվության փոփոխություններ: Ցույց է տրվել, որ նյարդային համակարգի նյարդակարգավորիչ D-սերինի քանակի կարգավորումը D-ամինաթթվային օքսիդազի մասնակցությամբ կարևոր նշանակություն ունի շիզոֆրենիայի, Պարկինսոնի, Ալցհեյմերի և այլ հիվանդությունների բուժման համար [4,7,9]:

Ցույց է տրվել նաև D-ամինաթթվային օքսիդազի կարևոր դերը աղիքային միկրոբիոտայի հոմեոստազի կարգավորման գործում [10]:

Վերջին տարիներին ֆերմենտի նկատմամբ հետաքրքրությունը մեծացել է կապված այն փաստի հետ, որ *Rhodotorulla gracilis*և*Trigonopsis variabilis* խմորասնկերում հայտնաբերված D-ամինաթթվային օքսիդազը կատալիզում է ցեֆալոսպորին C-ից 7-ամինացեֆալոսպորինաթթվի առաջացման երկֆերմենտային գործընթացի առաջին փուլը: Վերջինս համարվում է բազմաթիվ կիսասինթետիկ հակաբիոտիկների աղբյուր [2,13]:

Մեծ թվով հետազոտություններ են իրականացվում հատկապես մարդու D-ամինաթթվային օքսիդազի կենսասինթեզի էպիգենետիկական կարգավորման և բջջային մակարդակով հետ-տրանսլյացիոն ձևափոխումների դերի պարզաբանման ուղղությամբ [9]: Կենսաբանական նմուշներում D-ամինաթթուների և նրանց օքսիդազների ակտիվության որոշման զգայուն մեթոդների կիրառումը հիմք է կարող հանդիսանալ որոշ հիվանդությունների վաղ ախտորոշման և մոնիթորինգի համար [12]:

Ուստի արդիական են այն հետազոտությունները, որոնք ուղղված են տարբեր օրգանիզմներում D-ամինաթթվային օքսիդազների ելանյութային յուրահատկության բացահայտ-մանը [1]:

Մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել ճագարի որոշ օրգաններում (երիկամներ, լյարդ, ուղեղ) D-ամինաթթվային օքսիդազի ելանյութային յուրահատկությունը տարբեր D-ամինաթթուների նկատմամբ, ինչպես նաև հետազոտել որոշ ծանր մետաղների իոնների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտություններն իրականացվել են սնման և խնամքի միևնույն պայմաններում գտնվող 2-2.5 կգ զանգված ունեցող *Orictologus cuniculus domesticus* ճագարների վրա: Կենդանիների գլխատումից հետո արագ անջատվել են լյարդը, երիկամները և ուղեղը, պատրաստվել է 10%-անոց հոմոգենատ 0,1 Մ Na-ֆոսֆատայինբուֆերում (pH 8,3): Կորի-զայինֆրակցիան և հյուսվածքային մնացորդները հեռացնելու նպատակով հոմոգենատը ցենտ-րիֆուգվել է 4000 g արագությամբ 15 րոպե:

D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը որոշելու նպատակով 1 մլ ֆերմենտային պատրաստուկը ինկուբացվել է 37^0C-ում, 60 րոպեների ընթացքում, 1.5 մլ Na-ֆոսֆատային բուֆերում (pH 8,3) համապատասխան 50 մկմոլ ելանյութերի (D-ալանին, D-վալին, D-իզոլեյցին, D-թիրոզին, D-արգինին, D-լիզին, D-ասպարագին) առկայությամբ: 60 րոպե անց ռեակցիան կանգնեցվել է 1 մլ 20%-ոց ԵՔՔ-ով, առաջացած ամոնիակի քանակությունը որոշվել է միկրոդիֆուզիոն մեթոդով: Ֆերմենտի ակտիվությունը ներկայացվել է առաջացած NH_3-ի քանակով՝ 1 գ սպիտակուցի համար: D-ամինաթթվային օքսիդազի վրա ծանր մետաղների իոնների (Ni^{2+},Fe^{2+},Cu^{2+}, Zn^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+}) ազդեցությունը հետազոտելու նպատակով ինկուբացվող խառնուրդին ավելացվել է մետաղի իոն (25 մկմոլ /մլ նմուշում):

Ստացված տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման “BIOSTAT” համակարգ-չային ծրագրով: Հավաստիությունը որոշվել է ըստ Ստյուդենտի t չափանիշի:

Արդյունքներ և քննարկում:D-ամինաթթվային օքսիդազը ՖԱԴ-կախյալ օքսի-դազների գործունեության մեխանիզմների հիմնական օրինաչափությունների հե-տազոտման մարկերային ֆերմենտ է: Համաձայն գրականության տվյալների [9], մարդու D-ամինաթթվային օքսիդազի համար լավագույն ելանյութեր են հիդրոֆոբ և ծավալուն ամինաթթուները, իսկ գլիցինը և գլուտամինաթթուն ֆերմենտի կողմից չեն ենթարկվում դեզամինացման:

Մեր կողմից ուսումնասիրվել է ճագարի լյարդի, երիկամի և ուղեղի D-ամինա-թթվային օքսիդազի ելանյութային յուրահատկությունը: Համաձայն ստացված տվյալների (աղ. 1), D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվություն հայտնաբերվել է բոլոր հետազոտված օրգաններում, որտեղ ելանյութերը տարբերվել են իրենց դեզամինացման աստիճանով: Հետազոտված 7 ամինաթթուներից D-ալանինի, D-թիրոզինի և D-արգինինի դեպքում ֆերմենտը դրսևորել է բավականին բարձր ակտիվություն: Նշված ամինաթթուներն առավել ուժգին դեզամինացվել են ուղեղում, ընդ որում D-թիրոզինի դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը կազմել է 43.05, D-ալանինի դեպքում՝ 24.35, իսկ D-արգինինի դեպքում՝ 34 մկմոլ NH_3 1 գ սպիտակուցի հաշվարկով:

Բոլոր հետազոտված ամինաթթուներից ամենացածր ակտիվությամբ դեզա-մինացվել են ուղեղում՝ D-վալին, երիկամում՝ D-լիզին, լյարդում՝ D-իզոլեյցին ամի-նաթթուները (աղ. 1): Լյարդում ըստ դեզամինացման աստիճանի հետազոտված ամինաթթուների հերթականությունն եղել է՝ D-արգինին > D-լիզին > D-ասպա-րագինաթթու > D-ալանին> D-վալին> D-թիրոզին> D-իզոլեյցին: D-իզոլեյցին ամինաթթվի տարբերակում ֆերմենտի ակտիվությունը D-արգինինի համեմատությամբ եղել է 4.2 անգամ ավելի ցածր (աղ. 1):

Աղյուսակ 1.D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը ճագարի տարբեր օրգաններում (n=5, p<0,05)

ելանյութ \ օրգան	Ֆերմենտի ակտիվություն /մկմոլ $NH_3$1 գ սպիտակուցում/		
	լյարդ	երիկամ	ուղեղ
D-ալանին	11.29 ± 0.33	22.82 ± 0.68	24.35±0.73
D-վալին	8.23 ± 0.24	21.16 ± 0.63	0.94 ± 0.02
D- իզոլեյցին	7.05 ±0.21	15.05 ± 0.45	4.94 ± 0.14
D-թիրոզին	10.35 ± 0.31	17.64±0.52	43.05 ± 1.29
D-արգինին	29.48±0.88	15.52±0.46	34 ±1.02
D-լիզին	24.7±0.74	5.88±0.17	11.76 ±0.35
D-ասպարագինաթթու	18.35 ± 0.55	8.94 ± 0.26	36.7 ±1.10

Երիկամում դեզամինացման ամենաբարձր ցուցանիշ է գրանցվել D-ալանինի տարբերակում՝ 22.82 մկմոլ NH_3, ինչը 3.9 անգամ ավելի բարձր է D-լիզինի համեմատ: Ֆերմենտի ակտիվությունը ելանյութի նկատմամբ երիկամում ներկայացված է հետևյալ շարքով D-լիզին >D-ասպարագինաթթու > D-իզոլեյցին >D-արգինին> D-թիրոզին > D-վալին> D-ալանին:

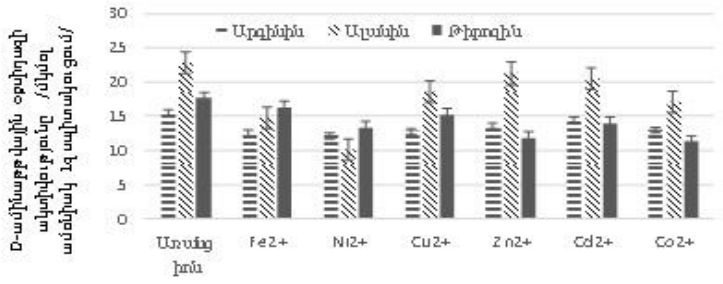
Այսպիսով, պարզվել է, որ ճագարի լյարդի, երիկամի և ուղեղի D-ամինաթթվային օքսիդազն օժտված է լայն ելանյութային յուրահատկությամբ: Համաձայն գրականության տվյալների, տարբեր աղբյուրներից անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազների ամինաթթվային հաջորդականության մեջ հայտնաբերված են պահպանողական հատվածներ (189–202, 299–312 և 326–341), որոնք ձևավորում են ակտիվ կենտրոնի կատալիտիկ հատվածը, որտեղ տեղավորված են կատալիզի համար պատասխանատու Ասն192, Արգ302 և Թիր326 ամինաթթուները [1]: Առանձնահատուկ է այն փաստը, որ Արգ302 ամինաթթվի -C-ատոմի շարժունակությունը բավականին սահմանափակ է կից գտնվող Պրո303 և Թիր326 ամինաթթվային մնացորդներով, որոնք ապահովում են ելանյութի մուտքը ակտիվ կենտրոն: Այս գործընթացում մասնակցում է նաև Գլի327-ը: Ֆերմենտի ելանյութ կապող դոմենում արտահայտված հոմոլոգիա չի հայտնաբերված, ինչով պայմանավորված է տարբեր աղբյուրներից անջատված ֆերմենտների լայն ելանյութային յուրահատկությունը, որը տատանվում է բավականին լայն տիրույթում [1]:

Շրջակա միջավայրը աղտոտող նյութերի շարքում հատուկ տեղ են զբաղեցնում ծանր մետաղները, քանի որ ի տարբերություն անկայուն և արագ վերափոխվող աղտոտող այլ նյութերի ծանր մետաղների միացությունները երկարատև ժամանակի ընթացքում պահպանում են իրենց թունավոր ազդեցությունը: Ծանր մետաղների հավելյալ քանակության վնասող ազդեցությունը կենդանի օրգանիզմներում կարող է առաջ բերել հանքային նյութերի մուտքի և տեղաբաշխման խանգարումներ, ֆերմենտների ակտիվության արգելակում:

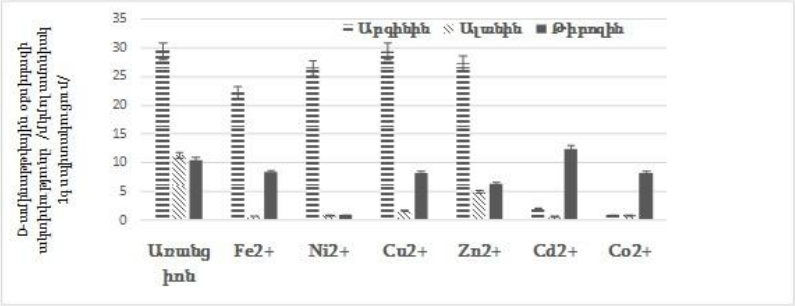
Մեր կողմից ուսումնասիրվել է որոշ ծանր մետաղների (Ni^{2+},Fe^{2+},Cu^{2+} , Zn^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+}) ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա: Որպես ելանյութեր ընտրվել են D-ալանին, D-թիրոզին և D-արգինին ամինաթթուները: Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են գծապատկեր 1, 2 և 3-ում:

Ինչպես երևում է նկ. 1-ից, երիկամում D-ալանինի դեզամինացման ակտիվության վրա ամենաբարձր արգելակող ազդեցություն դրսևորել է Ni^{2+}-ը՝ 55.7% -ով, իսկ Fe^{2+}-ի դեպքում այդ ցուցանիշը կազմել է 35.1%, մնացած իոնների արգելակող ազդեցությունը եղել է ցածր: D-արգինինի դեպքում իոնների ընկճող ազդեցություն ֆերմենտի ակտիվության վրա դիտվել է ըստ հետևյալ հաջորդականության՝ $Ni^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+}$: D-թիրոզինի դեզամինացման ակտիվության վրա ամենաբարձր արգելակող ազդեցություն ունեցել են Co^{2+}և Zn^{2+} իոնները համապատասխանաբար 35.94% և 33.10%-ով:

Լյարդում Ni^{2+},Cd^{2+}, Co^{2+} և Fe^{2+} իոնները գրեթե ամբողջությամբ արգելակել են D-ալանինը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվությունը, բացի Zn^{2+}իոններից, որոնք ֆերմենտը ընկճել են միայն 56.5%-ով:



Նկ.1. Ծանր մետաղների իոնների ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա (ճագարի երիկամ, n=5, p<0,05):



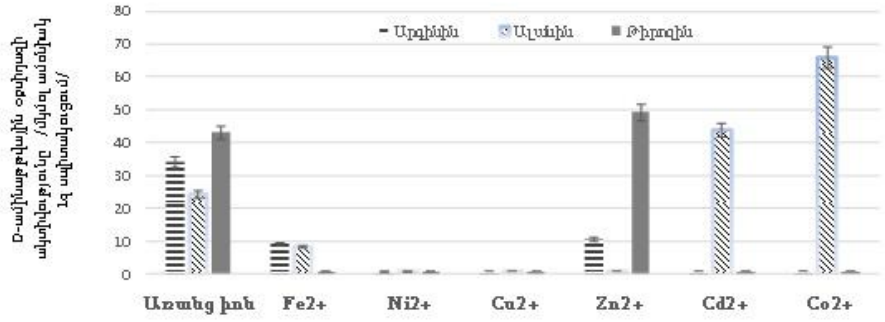
Նկ. 2.Ծանր մետաղների իոնների ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա (ճագարի լյարդ, n=5, p<0,05)

Փորձարկված իոններից D-արգինինը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվության վրա ընկճող ազդեցություն ցուցաբերել են Cd^{2+}և Co^{2+}իոնները,մնացած իոնները աննշան ազդեցություն են թողել ֆերմենտի ակտիվության վրա: Cd^{2+}իոնները 16.3 %-ով խթանել են D-թիրոզին ամինաթթվի դեզամինացումը, իսկ մյուս փորձարկված իոնների արգելակման աստիճանը ներկայացվում է հետևյալ շարքով Ni^{2+} >Zn^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Fe^{2+} > Cd^{2+}(նկ. 2):

Ինչպես երևում է գծապատկեր 3-ից, Ni^{2+}և Cu^{2+}իոնները բոլոր ամինաթթուների տարբերակներում ցուցաբերել են ընկճող ազդեցություն ֆերմենտի ակտիվության վրա: Zn^{2+}-ը խթանել են (12.5 %) D-թիրոզին ամինաթթվի, Cd^{2+}-ը (44.5%) և Co^{2+} (63.1 %) D-ալանինի դեզամինացման գործընթացները:

Ուսումնասիրված գրականության մեջ D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա ծանր մետաղների ազդեցության վերաբերյալ հետազոտությունները բացակայում են: Այլ ֆերմենտներին նվիրված աշխատանքներում ցույց է տրված, որ ակտիվ կենտրոնում գտնվող SH-խմբերը ծանր մետաղների իոնների համար կարող են կատարել յուրահատուկ լիգանդների դեր [5]: Հայտնի է նաև, որ ծանր մետաղների իոնները կարող են ամուր համալիրներ առաջացնել թիո խմբեր պարունակող կենսամոլեկուլների հետ: Այդպիսի համալիրները կայուն են և ֆերմենտի արգելակումը ձեռք է բերում ոչ դարձելի բնույթ [14]:

Մեր հետազոտությունների արդյունքների վերլուծությունը հանգեցնում է նրան, որ ծանր մետաղների իոնների արգելակող ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա հնարավոր է պայմանավորված է ֆերմենտային սպիտակուցի տարածական կառուցվածքի փոփոխություններով և առանձին թիոլային խմբերի վրա ունեցած ազդեցությամբ:



Նկ. 3.Ծանր մետաղների իոնների ազդեցությունը D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա ճագարի ուղեղում (n=5, p<0,05)

Հետազոտությունների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը ճագարի տարբեր օրգաններում կախված է ինչպես երկվալենտ մետաղի իոնի, այնպես էլ հյուսվածքի տեսակից:

D-ամինաթթվային օքսիդազների լայն ելանյութային յուրահատկությունը առաջարկվում է կիրառել կենսասենսորների ստեղծման համար սննդամթերքներում և խմիչքներում համակարգային ձևով ամինաթթուների D-իզոմերների պարունակությունը որոշելու նպատակով, քանի որ D-ամինաթթուները (առաջին հերթին D-ալանինը) բակտերիաների բջջապատի բաղադրիչներ են, ուստի նրանց առկայությունը սննդամթերքներում հանդիսանում է բակտերիային վարակման ցուցանիշ [11]:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ball J, Gannavaram S, Gadda G.*Structural determinants for substrate specificity of flavoenzymes oxidizing d-amino acids. Arch BiochemBiophys., *660*, 87-96,2018.
2. *Bolivar J.M., Nidetzky B.* Oriented and selective enzyme immobilization on functionnalized silica carrier using the cationic binding module Z basic2: design of a heterogeneous D-amino acid oxidase catalyst on porous glass. BiotechnolBioeng. 109, 6, 1490-1498,2012.
3. *Errico F., Di Maio A., Marsili V., Squillace M., Vitucci D., Napolitano F., Usiello A.*, Bimodal effect of D-aspartate on brain aging processes: insights from animal models. J BiolRegulHomeost Agents, *27*, 49-59, 2013.
4. *Ferraris D.V., Tsukamoto T.*Recent advances in the discovery of D-amino acid oxidase inhibitors and their therapeutic utility in schizophrenia. Curr Pharm Des.*17*, 2, 103-11,2011.
5. Khan .. Cao. Q. Latif. H. Vue X, zheng.H .." oil enzymatic actiItles and microbial community tructure with di fferent application rates of Cd and Pb·'. 1. mironmentalcience*19*, 834-840,2007.
6. *Lin T.S., Tsai H.J., Lee C.H., Song Y.Q., Huang R.S., Hsieh-Li H.M.*An improved drugs screening system reveals that baicalein ameliorates the Aβ/AMPA/NMDA-induced depolarization of neurons. J. Alzheimers Dis.,*56*, 959-976, 2017.
7. *Madeira C., Lourenco M.V., Vargas-Lopes C., Suemoto C.K., Brandão C.O., Reis T.*. D-Serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development. Transl. Psychiatry. *5*, 561,2015.
8. *Murtas G., Sacchi S., Valentino M., Pollegioni L.* Biochemical properties of human D-amino acid oxidase. Front. Mol. Biosci. *4*, 88, 10.3389, 2017b.
9. *Pollegioni L., Sacchi S., Murtas G.* Human D-Amino Acid Oxidase: Structure, Function, and Regulation.Front MolBiosci.,*28*, 107,2018.
10. *Sasabe J., Miyoshi Y., Rakoff-Nahoum S., Zhang T., Mita M., Davis B.M.*Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. Nat. Microbiol. *1*, 16125,2016.

11. *Shoja Y., Rafati A.A.* “Enzymatic biosensor based on entrapment of d-amino acid oxidase on gold nanofilm/MWCNTs nanocompositemodified glassy carbon electrode by sol-gel network: Analytical applications for d-alanine in human serum”, Enzyme Microb Technol.,*100*, 20-27, 2017.
12. *Szilágyi B., Ferenczy G.G., Keserű G.M.* Drug discovery strategies and the preclinical development of D-amino-acid oxidase inhibitors as antipsychotic therapies. Expert Opin Drug Discov., *13*, 973-982,2018.
13. *Tan Q., Qiu J., Luo X., Zhang Y., Liu Y., Chen Y., Yuan J., Liao W.* Progress in One-pot Bioconversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. Curr Pharm Biotechnol., *19*, 30-42,2018.
14. *Yang Z.,Zheng.D.* "Effect of cadmium, Zinc and lead on soil enz) m activiti ". J. Environmentcience,*18*, 1135- 1141, 2006.

Ստացվել է 15.11.2018