ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆԻ ԳԻՏԱԿԱՆ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЕРЕВАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Բնական գիտություններ 2, 2003 Естественные науки

Биология

УДК 591.1.05

А.Х. АГАДЖАНЯН, С.В. ЧУБАРЯН, Л.Р. ТУМАНЯН, А.А. НИКОЯН, М.С. МАРТИРОСЯН, А.А.АГАДЖАНЯН

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ И ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ВСКАРМЛИВАНИИ ИХ СОЛОДКОЙ И НАДРЕЗАНИИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

При вскармливании крыс солодкой значительно уменьшается активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах. У крыс с надрезанным седалищным нервом вскармливание солодкой приводит к резкому повышению активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина. Очевидно, при регенерации усиливается активность неуреотелического изоэнзима аргиназы, функционирующего в ферментативной системе биосинтеза пролина из аргинина через орнитин. В почках под действием солодки происходит увеличение активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина. Еще больше возрастает активность этих ферментов при вскармливании солодкой крыс с надрезанным седалищным нервом.

В организме орнитин в основном образуется в процессе расщепления аргинина аргиназой. В 70-х годах прошлого века подтвердилось также прямое участие орнитин-δ-трансаминазы в превращении орнитина в пролин.

Подробно исследовано превращение аргинина в пролин в молочной железе лактирующих крыс [1, 2].

По данным Алумот и др. [3], поглощение аргинина из крови в лактирующей молочной железе коз снижается при введении в организм экзогенного пролина.

В синапсах мозга мышей происходит превращение аргинина в орнитин под действием аргиназы с целью дальнейшего превращения его в пролин, глутамат, γ -аминомасляную кислоту (ГАМК) [4].

Пролин выступает как высококалорийный субстрат окисления (на уровне гексоз), активатор цикла Кребса [5], акцептор и донор водорода [6], химический медиатор ряда метаболических процессов [7].

Прослеживается накопление значительного количества пролина в экстремальных для организма условиях. Накопление пролина является одной из форм проявления биохимической адаптации. Пролин синтезируется из аргинина через орнитин реакцией, катализируемой аргиназой. В процессе синтеза пролина из орнитина участвуют два фермента – орнитин-δ-трансаминаза и пироллин-5-карбоксилатредуктаза. Работа посвящена изучению аргиназы и ферментов биосинтеза пролина в различных органах крыс.

Материал и методика. Объектами исследования служили белые крысы линии Вистар. Гомогенизацию тканей проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера–Эльвеейема с тефлоновым пестиком 5 раз по 30 секунд в 0,1*М* фосфатном буфере, pH 8. Использовали 10% гомогенат, при необходимости гомогенат разбавлялся. Активность аргиназы определяли по методу Ратнер и Паппаса [8]. Инкубационная смесь содержала 0,5*мл* ферментного препарата, 50*мкМ* L-аргинина в 0,04*М* глициновом буфере, pH 9,5. Объем смеси доводили до 2,5*мл* глициновым буфером. После часовой инкубации при 37°*С* реакцию останавливали добавлением 1*мл* 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). При необходимости пробы центрифугировали при 5000 об/*мин* в течение 15 мин. Аргиназная активность выражалась в *мкМ* мочевины.

Определение мочевины. Мочевину в пробах определяли методом Арчибалда [9], модифицированным Моура и Кауфманом. В пробирку с 2,5*мл* кислотной смеси (100*мл* конц. H_2SO_4+300*мл* конц. H_3PO_4+0,048*г* $FeCl_3$+ +0.237*г* $MnSO_4$ в 400*мл* H_2O) добавляли 1*мл* анализируемой смеси и 0,25*мл* 3% раствора диацетилмонооксима. Содержимое пробирок после тщательного встряхивания кипятили на водяной бане в темноте в течение 45 мин. Для колориметрирования использовали спектрофотометр СФ–4А, длина волны 478*нм*. Количество мочевины определяли по стандартной кривой.

Биосинтез пролина. Инкубационная смесь в объеме 3*мл* содержала 50*мкМ* L-орнитина, 20*мкМ* α-КГ, 1*мкМ* пиродоксаль-5-фосфата, 0,5*мл* гомогената в 0,05*М* калийфосфатном буфере, pH 7,4. Инкубация проводилась при 37°*С* в течение 1 часа. За это время орнитин среды под действием орнитинтрансаминазы (ОТ) превращается в пирролин-5-карбоновую кислоту (П5К). Затем в среду добавлялось 4*мкМ* НАДН и 0,5*мл* свежего гомогената, смесь инкубировалась еще 15 мин. Под действием пирролин-5-карбоксилатредуктазы (П5КР) П5К превращается в пролин. Активность ферментов биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) выражалась в *мкМ* образовавшегося пролина на грамм ткани. Определение пролина проводилось по Блюменкрантцу. Чувствительность метода составляет 1*мкг*. К 1*мл* образца добавляли 1*мл* нингидринового реагента (3*г* нингидрина в 180*мл* ледяной уксусной кислоты и 20*мл* формалина). Смесь кипятили 1 мин. при 100° или 4 мин. при 75°*С*, охлаждали в ледяной бане. Для колориметрирования использовали спектрофотометр, длина волны 515*нм*. Количество пролина определяли по стандартной кривой.

Результаты и обсуждение. Мы исследовали изменение активности ферментов биосинтеза пролина и аргиназы в различных органах крыс, вскормленных солодкой и находящихся в различных физиологических состояниях (см. табл. 1 и 2).

Данные табл. 1 свидетельствуют, что вскармливание солодкой приводит к значительному уменьшению активности ферментов биосинтеза пролина в печени крыс и, наоборот, к повышению – в почках. Во всех органах крыс с надрезанным седалищным нервом активность ферментов биосинтеза пролина уменьшается в 2–3 раза по сравнению со вскормленными и еще больше – с интактными. В то время как надрезание седалищного нерва приводит к значительному понижению активности ферментов биосинтеза пролина, вскармливание животных с надрезанным нервом

солодкой не только восстанавливает активность указанных ферментов, но даже активирует их.

Таблица 1

Активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах крыс при вскармливании солодкой (n=6) (мкмоль пролина на 1г ткани)

Органы	Интактная	Вскормленная солодкой	С надрезанным нервом	С надрезанным нервом и вскормленная солодкой
печень	255,6±11,3	157,8±7,3	59,5±4,4	315,4±13,3
почки	294,0±12,2	345,3±14,2	115,0±6,1	371,1±15,3
мозг	192,1±9,1	51,1±4,6	25,6±1,7	223,0±10,4

Таким образом, обнаруженное изменение активности ферментов биосинтеза пролина у крыс, находящихся в различных физиологических состояниях, свидетельствует о важной роли пролина в регенеративных и пролиферативных процессах, особенно при вскармливании их солодкой.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению активности аргиназы в различных органах крыс, вскормленных солодкой и находящихся в различных физиологических состояниях (см. табл. 2).

Таблица 2

Активность аргиназы в различных органах крыс при вскармливании солодкой (n=6) (мкмоль мочевины на 1г ткани)

Органы	Интактная	Вскормленная солодкой	С надрезанным нервом	С надрезанным нервом и вскормленная солодкой
печень	22608,0±11,3	8000,0±45,3	16761,0±90,3	25345,0±122,3
почки	522,0±17,3	570,0±21,7	340,0±14,3	691,0±24,3
мозг	12,1±1,2	21,4±1,2	12,2±0,9	22,3±1,4

Данные табл. 2 свидетельствуют, что по сравнению с ферментами биосинтеза пролина изменение активности аргиназы подвергается несколько другой закономерности.

Вскармливание интактных крыс солодкой приводит к уменьшению активности аргиназы в печени почти в 3 раза. Надрезание седалищного нерва снижает аргиназную активность в печени, однако не в такой степени, как при вскармливании. Более высокая аргиназная активность наблюдается в печени крыс с надрезанным седалищным нервом и вскормленных солодкой.

В почках и мозге крыс наблюдается иная закономерность. В почках при вскармливании солодкой происходит некоторое увеличение активноси аргиназы. Еще больше возрастает активность фермента почек у крыс с надрезанным нервом и вскормленных солодкой на фоне значительного понижения активности при надрезании седалищного нерва.

В мозгу крыс при вскармливании солодкой активность аргиназы увеличивается довольно значительно – почти в 2 раза. По-видимому, подобное активирование аргиназы в мозге и почках крыс при вскармливании солодкой обусловлено активированием неуреотелической формы фермента, обеспечивающей биосинтез пролина из аргинина через орнитин. Действи-

тельно, Давтяном показано, что аргиназа мозга имеет неуреотелический характер и не связана с механизмом нейтрализации аммиака [10]. Это свидетельствует о функционировании аргиназы (в частности ее неуреотелического изоэнзима) в ферментативной системе биосинтеза пролина, что обнаружено нами у многочисленных организмов, находящихся на различных уровнях эволюционного развития [11]. Однако, согласно данным табл. 1, вскармливание солодкой приводит к понижению активности ферментов биосинтеза пролина в мозге крыс, а при регенерации – к активации ферментов биосинтеза пролина. Этот факт нуждается в дополнительном разъяснении.

Наблюдаемое ингибирование активности аргиназы печени у вскормленных солодкой крыс по сравнению с интактными и повышение ее активности до уровня интактной при вскармливании крыс с надрезанным нервом солодкой – весьма своеобразное явление.

Аналогичное уменьшение активностей изученных ферментов было обнаружено нами ранее при изучении влияния экстрактов некоторых лекарственных растений (зверобой, тысячелистник, полынь) на обмен аргинина и пролина и накопление биомассы дрожжей [12]. Установлено особенно сильное подавление активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина экстрактами зверобоя. Выявлено уменьшение активности первого и второго изоэнзимов аргиназы дрожжей, выращенных на экстрактах зверобоя, в 3 и 6 раз соответственно. Авторами установлена довольно интересная закономерность, а именно: при росте дрожжей на экстрактах лекарственных растений обнаруживается обратная корреляция между содержанием свободного пролина, с одной стороны, и накоплением биомассы дрожжей и набором РНК – с другой. Что касается возрастания активности аргиназы в органах крыс с надрезанным нервом и вскормленных солодкой, то аналогичное повышение активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина обнаружено нами также при регенерации дождевого червя *Lumbricus terrestris*. При этом активность неуреотелического изоэнзима аргиназы повышается более чем в 9 раз, в то время как активность уреотелического изоэнзима – в 1,5 раз [13].

Таким образом, во всех вышеуказанных случаях, когда повышается потребность в пролине, индуцируется неуреотелическая аргиназа для обеспечения биосинтеза пролина субстратом – орнитином.

Кафедра биохимии

Поступила 22.05.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. **Yip M.C.M., Knox W.E.** – Biochem. J., 1972, v. 127, p. 893–899.
2. **Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М.** – Биолог. журн. Армении, 1979, т. 32, с. 1179–1184.
3. **Alumot E., Brusctae J., Tadmor A., Kenut C., Holmstein P.** – J. Daily Sci., 1983, v. 66, p. 1243–1251.
4. **Jonson T.L., Roberts E.J.** – Neurochem., 1984, v. 42, p. 1123–1126.
5. **Бритиков Е.А.** Биологическая роль пролина. М., 1975.
6. **Meister A.** Biochemistry of aminoacids, 1965.
7. **Ленинджер А.** Основы биохимии. М.: Мир, 1985.
8. **Ratner S., Pappas A.** – J. Biol. Chem., 1949, v. 119, p. 1183–1198.
9. **Archibald R.M.** – J. Biol. Chem., 1944, v. 156, p. 121–142.
10. **Давтян М.А., Бунятян Г.Х.** – Биохимия, 1970, т. 35, с. 412–418.
11. **Агаджанян А.Х.** Аргиназа, ферменты биосинтеза и катаболизма пролина в сравнительном аспекте: Автореф. дис. на соискание уч. ст. докт. биол. наук. Ер., 1990.

12. **Agadjanyan A.Kh., Martirosyan M.S., Agadjanyan A.A., Minasyan Z.S.** – Thesis' of conference of biotechnology. Damascus, 2001, p.147.
13. **Давтян М.А., Агаджанян А.Х., Гасспарян Х.Г.** – Биолог. журн. Армении, 1982, т. 35, с. 631–636.

Ա.Խ. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Ս.Վ. ՉՈՒԲԱՐՅԱՆ, Լ.Ռ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ, Ա.Ա. ՆԻԿՈՅԱՆ,
Մ.Ս. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Ա.Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԵՎ ՊՐՈԼԻՆԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՐԱՆՑ ՄԱՏՈՒՏԱԿՈՎ ԿԵՐԱԿՐԵԼՈՒ ԵՎ ՆՍԱՆՅԱՐԴԸ ՀԱՏԵԼՈՒ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ամփոփում

Առնետներին մատուտակով կերակրելիս նրանց տարբեր օրգաններում զգալիորեն նվազում է պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվությունը: Նստանյարդը հատված և մատուտակով կերակրված առնետների օրգաններում նկատվում է արգինազի և պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվության կտրուկ ավելացում: Հավանաբար, նստանյարդի ռեգեներացիայի ընթացքում ակտիվանում է արգինազի ոչ ուրեոթելիկ իզոէնզիմը, որը գործում է պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների համակարգում՝ ճեղքելով արգինինը օրնիթինի, որը ծառայում է որպես սուբստրատ պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների համար:

Առնետի երիկամներում մատուտակի ազդեցությամբ տեղի է ունենում արգինազի և պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների որոշակի ակտիվացում, որն էլ ավելի է ուժեղանում նստանյարդը հատելիս:

A.Kh. AGHADJANIAN, S.V. CHUBARIAN, L.R. TUMANIAN, A.A. NIKOIAN,
M.S. MARTIROSIAN, A.A. AGHADJANIAN

THE CHANGE OF THE ACTIVITY OF ARGINASE AND ENZYMES OF PROLIN BIOSYNTHESIS IN DIFFERENT ORGANS OF RATS AT FEEDING WITH *GLYCYRRHIZA GLABRA* AND INCISION *n. SHIACIC*

Summary

While feeding rats with *Glycyrrhiza glabra* the activity of enzymes of proline biosyntesis in different organs of rats decreases considerably. While feeding with *Glycyrrhiza glabra* of rats with incision of nervus shiacic brings to sharp growth of activity of arginase and enzymes of proline biosynthesis. Obviously, during regeneration the activity of non-ureotelic isoenzymes of arginase increases, functioning in enzymatic system of proline biosynthesys from arginine through ornithine. In kidneys under the impact of *Glycyrrhiza glabra* an increase of activity of arginase and enzymes of proline biosynthesis takes place. A greater increase of activity of these enzymes is observed while feeding with *Glycyrrhiza glabra* of the rats with incision of nervus shiacic.