

Биология

УДК 591.1.05

Н. С. ХАЧАТРЯН

ВЛИЯНИЕ ПАРАХЛОРМЕРКУРИЙБЕНЗОАТА НА ИЗОФЕРМЕНТЫ
АРГИНАЗЫ РАЗНЫХ ОРГАНОВ КРЫС В ПРИСУТСТВИИ
N^G-ГИДРОКСИАРГИНИНА

Исследовано влияние парахлормеркурийбензоата (ПХМБ) на активность изоферментов аргиназы печени, мозга и почек крыс в присутствии промежуточного соединения (N^G-гидроксиаргинина), катализирующего образование NO. Показано, что ингибирование активности неуреотелических изоферментов аргиназы исследованных органов с помощью ПХМБ усиливается воздействием N^G-гидроксиаргинина. Уреотелическая аргиназа печени не реагирует на воздействие ПХМБ и N^G-гидроксиаргинина.

Введение. Изоферменты аргиназы в зависимости от их метаболической направленности обладают характерными физико-химическими и кинетическими особенностями и различаются содержанием химически активных групп, играющих роль в проявлении активности и поддержании нативной конформации ферментов. С целью изучения указанных групп применяются методы химической модификации при помощи реагентов, избирательно взаимодействующих при определенных условиях с определенными аминокислотными остатками в белках. Указанными методами исследована роль SH-групп в проявлении активности аргиназы различных организмов [1–3]. Наиболее специфическим реагентом на тиоловые группы является парахлормеркурийбензоат (ПХМБ). Подробно были исследованы химически активные группы уреотелической и неуреотелической аргиназ. Активный центр уреотелической аргиназы не содержит тиоловых групп [4], тогда как неуреотелическая аргиназа содержит существенные для проявления активности SH-группы [5, 6].

В [7–9] показано, что аргиназа и NO-синтаза (катализирующая образование NO из аргинина) находятся в обратной корреляционной связи, так как аргиназа разрушает аргинин и тем самым лишает NO-синтазу субстрата. Соответственно, N^G-гидроксиаргинин (промежуточное соединение биосинтеза NO из аргинина) является мощным ингибитором аргиназы [10]. На основании наших исследований было показано, что аллостерическому ингибированию N^G-гидроксиаргинином подвергается неуреотелическая аргиназа, тог-

да как уреотелическая аргиназа не реагирует на воздействие ингибитора [11]. Целью представленной работы являлось исследование влияния ПХМБ и температуры (50°C) на изоферменты аргиназы печени, мозга и почек крыс в присутствии N^{G} -гидроксиаргинина.

Материал и методы исследования. Объектом исследований были белые крысы весом 150–200 г. После декапитации в холодных условиях быстро извлекали печень, мозг, почки и готовили гомогенаты на 0,2 М глициновом буфере, pH 9,5 (печень – 0,5 % вес/объем, мозг и почки – 10 %). Гомогенаты инкубировали 60 мин при температуре 37°C . Аргиназную активность определяли методом Ратнер [12] с некоторыми изменениями. Инкубационная смесь содержала 1 мл гомогената, 0,4 мл L-аргинина (50 мкмоль), 0,2 мл MnCl_2 (5 мкмоль), 1,8 мл 0,2 М глицинового буфера, pH 9,5. Гидроксиаргинин добавляли в инкубационную смесь в количестве 0,4 мл (2 мкмоль) [13], ПХМБ – 1, 3, 5, 7, 10 мкмоль на пробу (1 мл). После инкубации образовавшуюся мочевины расщепляли уреазой (инкубация 30 мин, pH 6,5). Реакцию останавливали добавлением 1 мл 20 %-й трихлоруксусной кислоты, а затем центрифугировали при 18000 g в течение 30 мин (центрифуга ЦЛР-1, Украина). Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой [14].

Результаты и обсуждение. С целью выяснения вопроса влияния ПХМБ на изоэнзимы аргиназы в присутствии N^{G} -гидроксиаргинина была проведена гельфильтрация (с помощью сефадекса G-100) гомогенатов печени, мозга и почек крыс. На заполненную сефадексом колонку ($2,5 \times 50 \text{ см}^2$) наносили 5 мл супернатанта, полученного при центрифугировании гомогенатов. Колонка была уравновешена 0,02 М Na-фосфатным буфером, pH 7,4, собирали по 4 мл, скорость элюции 1 мл/мин. Собрано 40 фракций. В каждой фракции спектрофотометрическим методом определяли белок (СФ-4А, длина волны 280 нм) и аргиназную активность. При гельфильтрации на сефадексе G-100 аргиназная активность печени “отражалась” 2-мя белковыми пиками – высокомолекулярным и низкомолекулярным, с объемами выхода соответственно 48–52 и 96–100 мл. Из гомогената мозга фермент был получен в одной фракции с объемом выхода 44–48 мл, из почек – в 2-х фракциях – высокомолекулярной (24–28 мл) и низкомолекулярной (72–76 мл).

Фракции изоферментов аргиназы инкубировали с ПХМБ (1–10 мкмоль на пробу) и с N^{G} -гидроксиаргинином (2 мкмоль) в сочетании с ПХМБ в течение 60 мин при 37°C . Полученные данные свидетельствуют о том, что ПХМБ в концентрации 1 мкмоль на пробу ингибирует неуреотелические изоферменты аргиназы печени, мозга и почек крыс (40; 54,5 и 65% соответственно), что согласуется с ранее полученными данными о тиоловом характере этого изофермента. Более высокие концентрации ПХМБ (3–10 мкмоль на пробу) полностью ингибируют активность неуреотелических изоферментов аргиназы исследованных органов.

В следующей серии экспериментов исследовали ингибирование неуреотелических изоферментов аргиназы печени, мозга и почек крыс под влиянием ПХМБ в присутствии N^{G} -гидроксиаргинина (промежуточного соединения образования NO). Результаты представлены на рис. 1–3. Согласно

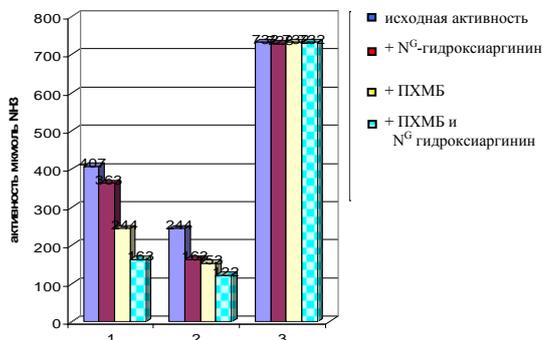


Рис. 1. Влияние ПХМБ (1 мкмоль на пробу) и N^G-гидроксиаргинина (2 мкмоль на пробу) на активность изоферментов аргиназы печени крыс: 1 – низкомолекулярный изофермент; 2 – слабоосновная фракция высокомолекулярного изофермента; 3 – сильноосновная фракция.

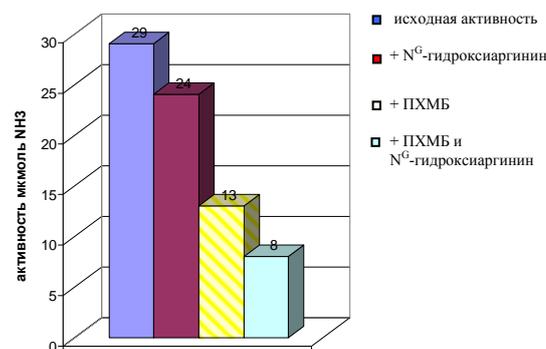


Рис. 2. Влияние ПХМБ (1 мкмоль на пробу) на активность изоферментов аргиназы мозга крыс в присутствии N^G-гидроксиаргинина.

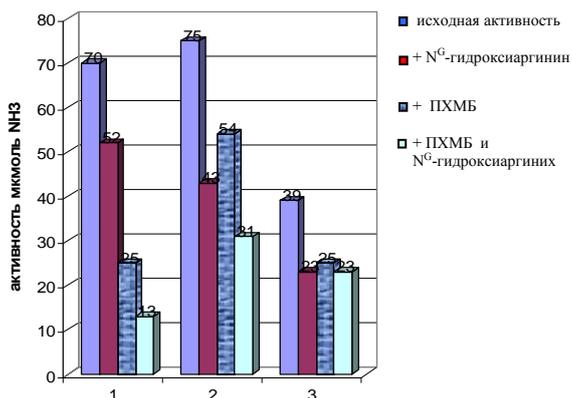


Рис. 3. Влияние ПХМБ (1 мкмоль на пробу) и N^G-гидроксиаргинина (2 мкмоль на пробу) на активность изоферментов аргиназы почек крыс: 1 – низкомолекулярный изофермент; 2 – слабоосновная фракция высокомолекулярного изофермента; 3 – сильноосновная фракция

полученным результатам, процесс ингибирования неуретелических изоферментов аргиназы печени, мозга и почек ПХМБ в концентрации 1 мкмоль на пробу в присутствии N^G-гидроксиаргинина усиливается. Активность неуретелической аргиназы печени в указанных условиях ингибируется на 60%, мозга – на 72,7%, почек – на 81,5%. Ранее было установлено, что при хроматографии на КМ-целлюлозе высокомолекулярного пика печени последний расщепляется на 2 четко разделяемых пика: один – с низкой, второй – с высокой ферментативной активностью, который по ряду физико-химических свойств (молекулярный вес, K_m , характер ингибирования ионами Mn^{2+} и др.) характеризуется как уреотелический фермент [15]. В новой серии экспериментов высокомолекулярный изофермент печени был разделен методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе. Активные фракции (4 мл) наносили на колонку (1,5 × 35 см²), наполненную катионообменником, уравновешенным 0,005 М трис-НСl буфером, рН 7,4. Была проведена градиентная элюция буфером, содержащим КСl в пределах концентрации 0,05–0,25 М. Собрано 32 фракции. Высокомолекулярный изофермент аргиназы печени, элюированный из колонки с сефадексом G-100 во фракциях 48–52 мл, при ионообменной хроматографии был разделен на 2 изофермента – слабоосновный и

сильноосновной, элюированных соответственно в присутствии 0,05 и 0,2 M KCl. Эти изоферменты аргиназы были подвергнуты воздействию ПХМБ (1–10 мкмоль на пробу) с последующей инкубацией с N^G-гидроксиаргинином (указано в методической части).

Согласно полученным результатам (рис. 1), неуреотелический изофермент аргиназы печени крыс подвергся ингибированию 1 мкмоль ПХМБ на 37,5%, а в присутствии 2 мкмоль N^G-гидроксиаргинина ингибирование усилилось и составило 50%.

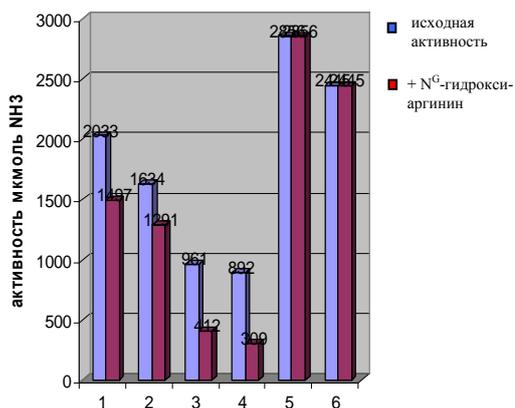


Рис. 4. Влияние N^G-гидроксиаргинина (2 мкмоль на пробу) на активность изоферментов аргиназы печени крыс, подвергшихся тепловой обработке (1, 3, 5 – 37°C; 2, 4, 6 – 50°C): 1, 2 – низкомолекулярный изофермент; 3, 4 – слабоосновная фракция высокомолекулярного изофермента; 5, 6 – сильноосновная фракция

Более высокие концентрации ПХМБ (3–10 мкмоль) полностью инактивируют изофермент. В то же время, обнаруженный нами уреотелический изофермент аргиназы печени крыс не реагирует на воздействие ПХМБ, что, как уже было сказано выше, согласуется с данными о том, что активный центр уреотелической аргиназы не содержит тиоловых групп. Уреотелический изофермент аргиназы печени крыс не реагирует также на воздействие N^G-гидроксиаргинина, что согласу-

ется с нашими данными о том, что уреотелическая аргиназа в отличие от неуреотелической не участвует в регуляции биосинтеза NO. Таким образом, неуреотелическая аргиназа, являясь тиоловым ферментом, в присутствии N^G-гидроксиаргинина, который, вероятно, связывается с регуляторным центром, не десенситизируется (рис. 1–3).

В последующей серии экспериментов выявляли возможность термической десенситизации в присутствии аллостерического ингибитора (N^G-гидроксиаргинина) изоферментов аргиназы печени, мозга и почек крыс. Для этого активность последних исследовали после тепловой обработки (инкубация при 50°C в течение 60 мин). Полученные результаты изображены на рис. 4, 5.

Как видно из рисунков, изоферменты аргиназы печени, мозга

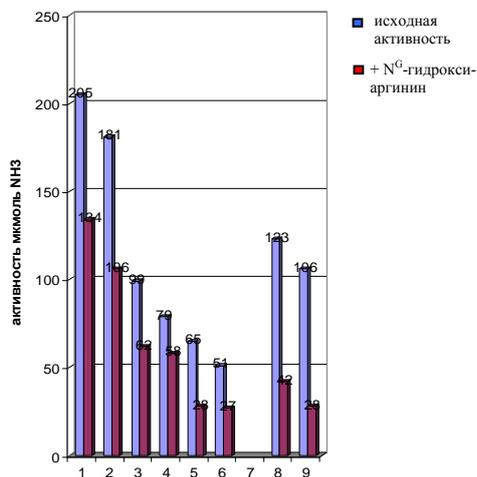


Рис. 5. Влияние N^G-гидроксиаргинина (2 мкмоль) на активность изоферментов аргиназы почек (1–6) и мозга (8, 9) крыс, подвергшихся тепловой обработке (1, 3, 5, 8 – 37°C; 2, 4, 6, 9 – 50°C): 1, 2 – низкомолекулярный изофермент; 3, 4 – слабоосновная фракция высокомолекулярного изофермента; 5, 6 – сильноосновная фракция.

и почек, полученные при гельфильтрации и ионообменной хроматографии вышеуказанными методами, при тепловой обработке (50⁰C) подвергаются инактивации. Так, неуретелические изоферменты печени инактивируются на 19,7 и 7%, уреотелический изофермент печени – на 14,5%. Неуретелические изоферменты почек инактивируются на 11,5; 20,3 и 21,3%, а мозга – на 14%.

Как и следовало ожидать, инактивирование в присутствии N^G-гидроксиаргинина усиливается воздействием тепла: при 50⁰C сильнее, чем при 37⁰C. Если при 37⁰C ингибирование неуретелических изоферментов аргиназы печени составляет 26,4 и 57,2%, то при 50⁰C – 30 и 65% соответственно. Неуретелические изоферменты аргиназы почек при 37⁰C ингибируются N^G-гидроксиаргинином на 34,8; 26,4; 57,8 и 73,9% соответственно. Уреотелическая аргиназа как при 37⁰C, так и при 50⁰C не реагирует на воздействие N^G-гидроксиаргинина.

Таким образом, при тепловой инактивации изоферментов аргиназы печени, мозга и почек крыс N^G-гидроксиаргинин в некоторой степени усиливает воздействие тепла. Очевидно, N^G-гидроксиаргинин связывается с регуляторным центром, что повышает чувствительность фермента к воздействию температуры.

Кафедра биохимии

Поступила 13.06.2011

ЛИТЕРАТУРА

1. Джакуджан Н.Дж., Арутюнян Т.Г., Хачатрян М.А., Давтян М.А. Биология. Межвуз. сб. научн. тр. Ер., 1979, № 1, с. 234–237.
2. Muhlrad H., Heggi J., Toth J. Acta Biochem. Biophys., 1967, v. 2, p. 19.
3. Wright L.C., Brady C.J., Hide R.W. Phytochemistry, 1981, v. 20, p. 2641.
4. Давтян М.А., Геворкян М.Л. Ученые записки ЕГУ, 1997, № 1, с. 40–47.
5. Туманян Л.Р., Чубарян С.В., Торчян Р.О., Мовсисян А.С. Биол. ж. Армении, 1983, т. 36, № 6, с. 485–489.
6. Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Абрамян А.Ж., Давтян М.А. Биол. ж. Армении, 1986, т. 39, № 6, с. 502–507.
7. Hrabak A., Temesi A., Csuka I., Antoni F. Comp. Biochem. Physiol. B., 1992, v. 103, № 4, p. 839–845.
8. Vockley J.G., Jenkinson C.P., Shuka H., Kern R.M., Gredi W.W., Cederbaum S.D. Genomics, 1996, v. 38, № 2, p. 118–123.
9. Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash. D.E., Christianson D.W. Nature, 1996, v. 383, № 6600, p. 554–557.
10. Daohich F., Fukuto J.M., Asch D.E. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, v. 202, № 1, p. 174–180.
11. Давтян М.А., Карапетян С.А., Хачатрян Н.С. МАНЕБ, 2011, т. 16, № 5, с. 45.
12. Rathner S., Pappas A. Biochem. J., 1949, v. 179, p. 1183.
13. Daghig F., Fukuto J.M. and Ask D.E. J. Biochem. Bioph. Res. Commun., 1994, v. 202, № 1.
14. Силакова А.И., Труш Г.П., Явилякова А. Вopr. мед. химии, 1962, т. 5, с. 538.
15. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Биол. ж. Армении, 1979, т. 32, № 12, с. 1176–1178.

Ն. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ՊԱՐԱԶԼՈՐՄԵՐԿՐԻԲԵՆԶՈՒՍԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆՆ ԱՌՆԵՏԻ
ՏԱՐԲԵՐ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԻՋՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ N^G -ՀԻԴՐՕՔՍԻԱՐԳԻՆԻՆԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՆ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է պարաքլորմերկրիբենզոատի ազդեցությունը առնետների լյարդի, ուղեղի, երիկամների արգինազայի իզոֆերմենտների ակտիվության վրա, NO-ի միջանկյալ պրոդուկտ հանդիսացող HO-արգինինի առկայության պայմաններում: Ցույց է տրված, որ հետազոտվող օրգաններում ոչ ուրեթելիկ արգինազի ակտիվության արգելափակումը պ-քլորսնդիկային-բենզոատով բերում է N^G -հիդրօքսիարգինինի ազդեցության խթանման: Լյարդի ուրեթելիկ արգինազայի վրա չի ազդում ո՛չ պ-քլորսնդիկային-բենզոատն, ո՛չ N^G -հիդրօքսիարգինինը:

N. S. KHACHATRYAN

INFLUENCE OF p-CHLOROMERCURIBENZOATE ON THE ARGINASE
ISOENZYMES OF RAT ORGANS IN THE PRESENCE
OF N^G -HYDROXIARGININE

Summary

The influence of p-chloromercuribenzoate on rat liver, brain, and kidney arginase isoenzymes activity in the presence of intermediate compound N^G -hydroxiarginine was investigated. It is shown that inhibition enhancement nonureothelic arginases of investigated organs by p-chloromercuribenzoate increases the influence of N^G -hydroxiarginine. Liver ureothelic arginase does not react to the presence of p-chloromercuribenzoate and N^G -hydroxiarginine.