ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆԻ ԳԻՏԱԿԱՆ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЕРЕВАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Բնական գիտություններ 3, 2004 Естественные науки

Կենսաբանություն

УДК 533.9.57

Ա. Խ. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Զ. Ս. ՄԻՆԱՍՅԱՆ, Ա.Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ,
Ա.Ա. ՁԱԽԱՐՅԱՆ, Լ.Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ

ՊՐՈԼԻՆԻ ԿԱՏԱԲՈԼԻԶՄԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ ԻՇԽԱՆ ՁԿԱՆ (*SALMO ISCHCHAN*) ՏԱՐԲԵՐ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ներածություն: Պրոլինի վերածումը գլյուտամատի տեղի է ունենում պրոլինօքսիդազ (ՊՕ) և պիրոլին-5-կարբօքսիլատ-դեհիդրոգենազ (Պ5ԿԴ) ֆերմենտների մասնակցությամբ: Պրոլինի օքսիդացման պրոցեսին մասնակցում է նաև ցիտոքրոմ c-ն՝ որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր [1]: Ռեակցիան գրեթե չի ընթանում օքսիդացված ՆԱԴՖ-ով: Կապույտ ճանճի (*Phormia regina*) միտոքոնդրիումներում պրոլինի օքսիդացման պրոցեսը խթանվում է ԱԿՖ-ով, ռոտենոնով և արսենատով [2]: *E.coli*-ի բջիջներից ստացված Պ5ԿԴ ֆերմենտը մաքրման է ենթարկվել 350 անգամ [3]:

Ինչպես վկայում են [4]-ի հեղինակները, CATCH-22 սինդրոմով հիվանդ մարդկանց արյան պլազմայում հայտնաբերվել է պրոլինի բարձր քանակություն: Սինդրոմը արտահայտվում է էպիլեպսիայով, գիրությամբ, հիպոկալցինեմիայով և արտաքին դիմորֆիզմով: Պրոլինօքսիդազի թույլ ակտիվությունը հանգեցնում է պրոլինի կատաբոլիզմի խախտմանը: Հեղինակները գալիս են այն եզրակացության, որ CATCH-22 սինդրոմը պայմանավորված է ՊՕ-ի քրոմոսոմի 22g11 գենի էքսպրեսիայով:

Հետազոտման օբյեկտը և մեթոդները: Աշխատանքում ուսումնասիրվել է ՊՕ-ի և Պ5ԿԴ-ի ակտիվությունը լճերում աճեցված իշխան ձկան (*Salmo ischchan*) տարբեր օրգաններում: Պրոլինի կատաբոլիզմի ֆերմենտների ակտիվության որոշման համար պատրաստվել է 10%-ոց հոմոգենատ: Հոմոգենացման համար որպես միջավայր է ծառայել կալիում-նատրիում-ֆոսֆատային բուֆերը (pH=8,0): Հոմոգենացումը կատարվել է Պոտեր–Էլվեջիեմի ապակյա հոմոգենատորով:

Պրոլինի կատաբոլիզմի ֆերմենտների ակտիվության որոշումը: Պատրաստվել է ինկուբացիոն խառնուրդ, որը պարունակել է 53*մՄ* կալիում-նատրիում-ֆոսֆատային բուֆեր (pH=8,0), 0,2*մՄ* L-պրոլին, 1,6*մկՄ* ցիտոքրոմ

քրոմ-c, 4*մկՄ* ՆԱԴ$^+$, 0,5*մլ* հոմոգենատ և յուրաքանչյուր տարբերակում համապատասխան քանակներով էֆեկտորներ: Ինկուբացիան կատարվել է 37^0C ջերմաստիճանում՝ 1 ժամ տևողությամբ: Ինկուբացիայից հետո ռեակցիան կանգնեցվել է 96%-ոց էթիլային սպիրտով: Նմուշները ցենտրիֆուգվել են 8000*g* արագացումով 10 րոպե: ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունները որոշվել են ըստ առաջացած գլյուտամատի քանակության: Գլյուտամատը որոշվել է քրոմատոգրաֆիկ եղանակով [5]: Վերջինիս քանակությունը որոշելու համար կատարվել է էլյուցիա 0,1%-ոց $CdCl_2$-ի 60%-ոց սպիրտային լուծույթով 1 ժամ տևողությամբ: Գունաչափումը կատարվել է ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով:

Միտոքոնդրիումների անջատումը: Միտոքոնդրիումները անջատելու համար հոմոգենատը սառը պայմաններում ցենտրիֆուգվել է 10 րոպե 500*g*-ով: Նստվածքը թափվել է, իսկ վերնստվածքը լուծվել է 4*մլ* 0,01*Մ*-ոց տրիս-HCl բուֆերում և ցենտրիֆուգվել է 30 րոպե 15 000*պտ/ր* արագությամբ: Այդ պրոցեսը կրկնվել է 3 անգամ: Վերջին անգամ նստվածքին ավելացվել է 10%-ոց էթիլային սպիրտ, սառեցվել է, ապա հալեցվել և ցենտրիֆուգվել 30 րոպե 15 000*պտ/ր* արագությամբ: 0,01*Մ*-ոց տրիս-HCl բուֆերում (pH=8,2) ստացված նստվածքը իրենից ներկայացնում է միտոքոնդրիումների ֆրակցիան: Տվյալների վիճակագրական մշակումը իրականացվել է Վոզնեսենսկու կողմից նկարագրված մեթոդով [6]:

Փորձերի արդյունքները: Մինչև բեղմնավորումը կատարված ուսումնասիրությունների տվյալները (տես աղ. 1) ցույց են տալիս, որ ՊՕ-ի ամենաբարձր ակտիվությունը հայտնաբերվել է իշխան ձկան սրտում (5,21*մկմոլ*), իսկ ամենացածր ակտիվությունը՝ երիկամներում (1,19*մկմոլ*):

Աղյուսակ 1

ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը իշխան ձկան տարբեր օրգաններում (մկմոլ գլյուտամատ 1գ թարմ հյուսվածքում, n=5, M±m)

Օրգանները	ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը	ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը ձվադրման շրջանում	
		արու	էգ
երիկամներ	1,19±0,08	4,02±0,29	16,98±0,98
լյարդ	2,12±0,14	4,42±0,30	8,47±0,61
սիրտ	5,21±0,037	6,2±0,40	11,30±0,76
խռիկներ	2,74±0,11	5,32±0,38	28,47±1,05
ուղեղ	2,67±0,19	4,64±0,31	5,19±0,37
ձկնկիթ	1,26±0,32	–	7,79±0,55

Ձվադրման շրջանում արու և էգ ձկների տարբեր օրգանների ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ուսումնասիրությունները վկայում են, որ նրանց բոլոր օրգաններում պրոլինի կատաբոլիզմի ֆերմենտների ակտիվությունը նախորդ տվյալներից բարձր է:

Ձվադրման շրջանում արուների երիկամների ֆերմենտների ակտիվությունը ավելանում է 3,5 անգամ, իսկ էգերինը՝ 13 անգամ: Էգերի խռիկների ֆերմենտների ակտիվությունը ավելանում է ավելի քան 10

անգամ: Էգերի և արուների ֆերմենտների ակտիվությունների տարբերությունները բացատրվում են սեռական դիմորֆիզմով: Ակնհայտ է, որ օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական փոփոխությունների ժամանակ տեղի է ունենում մետաբոլիկ պրոցեսների վերակառուցում և պրոլինը գլյուտամատի միջոցով ակտիվ ներգրավվում է փոխանակային պրոցեսների մեջ՝ լրացնելով բջջի էներգետիկ պահանջները:

Ուսումնասիրվել է նաև իշխան ձկան տարբեր օրգանների միտոքոնդրիումներում պրոլինի ճեղքման ֆերմենտների ակտիվությունը: Ստացված տվյալները բերված են աղ. 2-ում:

Աղյուսակ 2

ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը իշխան ձկան տարբեր օրգանների միտոքոնդրիումներում (մկմոլ գլյուտամատ 1գ թարմ հյուսվածքում, n=5, M±m)

Օրգանները	ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը
երիկամներ	3,18±0,22
լյարդ	3,61±0,28
սիրտ	5,42±0,38
խոիկներ	4,76±0,32
ուղեղ	3,76±0,29

Տվյալները ցույց են տալիս, որ պրոլինի ճեղքման ֆերմենտները ունեն հիմնականում միտոքոնդրիալ տեղակայում:

Հաջորդ շարքի փորձերը նվիրված են տարբեր էֆեկտորների ազդեցությանը պրոլինի օքսիդացման ֆերմենտների ակտիվության վրա իշխան ձկան տարբեր օրգաններում: Տվյալները ամփոփված են աղ. 3-ում:

Էֆեկտորների ընտրությունը կատարվել է այն փաստից, որ նրանցից երկուսը հանդիսանում են գլիկոլիզի առանցքային ֆերմենտներից մեկի՝ ֆոսֆոֆրուկտոկինազի ինհիբիտորներ (ցիտրատ և ԱԵՖ), իսկ մյուսները այդ ֆերմենտի համար համարվում են ակտիվատորներ (ԱՄՖ և ԱԿՖ):

Ինչպես ցույց են տալիս աղ. 3-ի տվյալները, ցիտրատը իշխան ձկան միայն երիկամներում և լյարդում է խթանում պրոլինի կատաբոլիզմի ֆերմենտների ակտիվությունը, մինչդեռ ծածան ձկան դեպքում [7] այն խթանում է նշված ֆերմենտների ակտիվությունը բոլոր օրգաններում: Ըստ երևույթին, ցիտրատը, ճնշելով գլիկոլիզի պրոցեսը, միաժամանակ խթանում է այլ ուղիների գործունեությունը: Իշխան ձկան տարբեր օրգանների ֆերմենտների ակտիվությունների (ցիտրատով խթանված) տարբերությունները, հավանաբար, պայմանավորված են այդ ֆերմենտների ֆիզիկաքիմիական հատկությունների տարբերությամբ: Ինչ վերաբերում է ծածան ձկան համապատասխան օրգանների ֆերմենտների ակտիվությունների հետ ունեցած տարբերություններին, ապա դա, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է իշխանի քաղցրահամ ջրերում բնակվելու հանգամանքով (քաղցրահամ ջրերում բնակվող ձկները՝ ի տարբերություն աղի ջրերում բնակվողների, առավել զգայուն են արտաքին միջավայրի ազդակների հանդեպ):

Աղյուսակ 3

Տարբեր էֆեկտորների ազդեցությունը ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվության վրա իշխան ձկան տարբեր օրգաններում (մկմոլ գլյուտամատ 1գ թարմ հյուսվածքում, n=5, M±m)

Օրգանները	Էֆեկտորները*	ՊՕ-ի և ՊՏԿԴ-ի ակտիվությունը
երիկամներ	առանց էֆեկտոր	3,93±0,28
	ցիտրատ	12,30±0,75
	ցիտրատ+ԱԵՖ	1,89±0,12
	ԱՄՖ	0
	ԱԿՖ	0
	ԱԵՖ	0
լյարդ	առանց էֆեկտոր	4,51±0,31
	ցիտրատ	7,61±0,53
	ցիտրատ+ԱԵՖ	2,82±0,20
	ԱՄՖ	5,24±0,37
	ԱԿՖ	19,60±0,97
	ԱԵՖ	6,55±0,45
սիրտ	առանց էֆեկտոր	6,35±0,43
	ցիտրատ	0
	ցիտրատ+ԱԵՖ	0
	ԱՄՖ	2,62±0,19
	ԱԿՖ	5,24±0,37
	ԱԵՖ	7,86±0,54
խռիկներ	առանց էֆեկտոր	5,24±0,37
	ցիտրատ	0
	ցիտրատ+ԱԵՖ	0
	ԱՄՖ	1,31±0,09
	ԱԿՖ	5,24±0,37
	ԱԵՖ	0
ուղեղ	առանց էֆեկտոր	4,97±0,33
	ԱՄՖ	0
	ԱԿՖ	7,86±0,54
	ԱԵՖ	10,48±0,72

* ԱԵՖ-ի, ԱՄՖ-ի և ԱԿՖ-ի կոնցենտրացիաները՝ 10^{-6} *Մ*, ցիտրատինը՝ $3 \cdot 10^{-5}$ *Մ*:

Աղյուսակ 3-ի տվյալները նաև վկայում են, որ ԱՄՖ-ի առկայությամբ պրոլինի օքսիդացման պրոցեսը ընդհանրապես ճնշվում է՝ բացառությամբ լյարդի և սրտի ֆերմենտների: Ըստ երևույթին, դա բացատրվում է նրանով, որ անաերոբ գլիկոլիզը, այդ էֆեկտորով խթանվելով, մրցակցում է պրոլինի օքսիդացման պրոցեսի հետ՝ առավել էֆեկտիվ ապահովելով բջջի էներգետիկ պահանջները:

Կենսաքիմիայի ամբիոն

Ստացվել է 10.07.2003,
վերամշակումից հետո՝ 02.02.2004

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. **Johnson A.B., Strcker H.J.** – J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p. 1876–1881.
2. **Hansford R.G., Sacktor B.** – J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 991–994.
3. **Scarpulla R.C., Soffer R.L.** – J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 5997–6001.
4. **Jaeken J., Gocmans N., Fryns J.P., Franois I., de Zegher F.** – J. Inherit. Metab. Dis., 1996, v. 19, № 3, p. 275–277.
5. **Lissitzky S., Laurent S.** – Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, p. 1137–1142.
6. **Вознесенский В.Л.** Первичная обработка экспериментальных данных. Л., 1969.
7. **Агаджанян А.Х., Минасян З.С., Давтян М.А.** – Биолог. ж. Армении, 2001, с. 87–89.

А. Х. АГАДЖАНЯН, З. С. МИНАСЯН, А. А. АГАДЖАНЯН,
А. А. ЗАХАРЯН, Л. Г. АНАНЯН

ФЕРМЕНТЫ КАТАБОЛИЗМА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ ФОРЕЛИ (*SALMO ISCHCHAN*)

Резюме

Изучены активности пролиноксидазы (ПО) и пиролин-5-карбоксилат-дегидрогеназы (П5КД) в различных органах форели. Высокая активность ферментов обнаружена в сердце рыбы по сравнению с таковой в остальных органах. В период откладки икринок в почках самок активность ферментов окисления пролина возрастает в 13 раз, а в почках самцов-в 3,5 раза. Во всех изученных органах, за исключением сердца и жабр, цитрат значительно стимулирует активность ПО и П5КД. Комплекс цитрат+АТФ в печени стимулирует активность указанных ферментов более чем в 4 раза.

A. Kh. AGHAJANYAN, Z. S MINASYAN, A. A. AGHAJANYAN,
A. A. ZAKHARYAN, L. G. ANANYAN

ENZYMES OF PROLINE DEGRADATION AND THEIR REGULATION IN DIFFERENT ORGANS OF *SALMO ISCHCHAN*

Summary

Activation of proline oxidaze(PO) and pirolin-5-caroxilate-dehidrogenaze (P5KD) in the organs of *Salmo ischchan* has been investigated. In comparison with other organs high activity of the enzymes has been found in the heart of fish. The activity of proline degradation enzymes in kidney increases 13 times during laying of hardroe of the females and in the kidney of the male – 3,5 times. Citrate stimulates the activity of PO and P5KD in all organs, except the gills and the heart. The complex of citrate and ATP in liver stimulates the activity of the mentioned enzymes over 4 times.