

*Կենսաբանություն*

УДК 577:155.34.615.5

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏԻ ԵՎ *RANA RIDIBUNDA* ԳՈՐՏԻ ԼՅԱՐԳԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ  
ԷԴՏԱՆՈՎ ԱՊԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

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

*ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոն, Հայաստան*

**Քանայի քառեր.** դարձելի ապակտիվացում, իզոֆերմենտներ, ուրեոտելիկ արգինազ:

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

Կենսաքիմիայի ամբիոնում կատարված աշխատանքները ցույց են տվել, որ գորտի լյարդի ուրեոտելիկ 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 ԷՊՈ-ի սպեկտրների տվյալները, որոնց հետազոտությունները ցույց են տվել, որ գորտի լյարդի ուրեոտելիկ 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](mailto:tamara.simonyan@gmail.com)

մի շարք հետազոտողների կողմից [2, 3]: Օրինակ՝ առնետների կաթնագեղձի արգինազը լիովին արգելակվում է pH 6-ի պայմաններում, ԷԴ-SU-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՝ ԷԴ-SU-ի ավելացումից հետո [5]: Յուլի լյարդի արգինազը նույնպես ապասկտիվանում է ԷԴ-SU-ով՝ Mn-ը կապելու ճանապարհով: Ըստ հետազոտողների մեծ մասի ապասկտիվացումն ԷԴ-SU-ի ազդեցությամբ, ուղեկցվում է ֆերմենտի ենթամիավորների տրոհմամբ [6]:

**Հետազոտության մեթոդները:** Հետազոտվել են լճային գորտը (*R. 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 Ռ-ատների 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 ապասկտիվացումը կատարվել է ԷԴ-SU-ի ազդեցությամբ, որի վերջնական կոնցենտրացիան եղել է  $5 \cdot 10^{-2}$  մոլ:

**Հետազոտությունների արդյունքները և քննարկումը:** Կատարվել է ֆերմենտի ապասկտիվացումն ԷԴ-SU-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 ԷԴ-SU-ով ապասկտիվացման գործընթացի վրա (n=6)

Արգինազի ակտիվությունը, մկմոլ/գ				
միջավայրի pH-ը				
նմուշը	7,4	8,6	9,0	9,5
եյակետային ակտիվությունը	29380	29380	29380	29380
ապասկտիվացված արգինազը (120')	2056	2651	1805	1920
ապասկտիվացման 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 ԷԴ-SU-ով ապասկտիվացման գործընթացի վրա: Բոլոր հետազոտված pH-ների պայմաններում գորտի լյարդի արգինազը 2 ժ ընթացքում ապասկտիվացել է գործնականորեն հավասար չափով (91–94%):

Գրականությունից հայտնի է, որ ԷԴ-SU-ի ազդեցության տակ տարբեր օբյեկտներից անջատված արգինազներն ենթարկվում են տրոհման: Օրինակ՝ մարդու թոքերի, լյարդի և երիկամների արգինազները (մոլ. զանգվածը՝ 120000 Դալտոն) ԷԴ-SU-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 ԷԴ-SU-ի ազդեցությամբ կատարվում է ֆերմենտի ապասկտիվացում, 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 ապասկտիվացման գործընթացի վրա (n=4)

Միջավայրի pH-ը								
ապասկտիվացման տևողությունը, րոպե	7,4	ապակ., %	8,6	ապակ., %	9,0	ապակ., %	9,5	ապակ., %
Երկեստային 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 ապասկտիվացման գործընթացի վրա: Այս դեպքում 4 ժ հետո pH 7,4-ի պայմաններում ապասկտիվացման տոկոսը կազմում է մոտ 82%, pH-ը 8,6-ի դեպքում 44%: Ապասկտիվացման գործընթացը խիստ դանդաղում է pH 9,0 և pH 9,5 դեպքում՝ հասնելով 10–15%:

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

Ստացած տվյալները կարելի է բացատրել այն փաստով, որ ԷԴՏԱ-ով ապասկտիվացման 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 հիդրօքսիդների 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 ապասկտիվացումը 2 ջերմաստիճանային ռեժիմների պայմաններում (0°C; 20°C): Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են աղյ. 3 և 4-ում:

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

## Աղյուսակ 3

Ջերմաստիճանի ազդեցությունը *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴ-SU-ով  
ապասկտիվացման գործընթացի վրա (n=6)

Նմուշը	Արգինազի ակտիվությունը, մկմո/գ			
	0°C	ապակ., %	20°C	ապակ., %
Էլակետային ակտիվությունը	30890	–	30890	–
2 ժ հետո	30000	–	2780	90
22 ժ հետո	27800	10	–	–

## Աղյուսակ 4

Ջերմաստիճանի ազդեցությունը սպիտակ առնետի լյարդի արգինազի ԷԴ-SU-ով  
ապասկտիվացման գործընթացի վրա (n=4)

Նմուշը	0°C	Ապակ., %	20°C	Ապակ., %
Էլակետային ակտիվությունը	1699	–	1699	–
ապասկտիվացման 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°C-ի պայմաններում հետազոտվող ֆերմենտն 30 *րոպե* անց կտրուկ ապասկտիվանում 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 ապասկտիվանում է 79%-ով, իսկ *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազան 2 ժ հետո ապասկտիվանում է 90%-ով: 0°C պայմաններում ԷԴ-SU-ով ապասկտիվացումը 22 ժ հետո կազմում է 18,6%, իսկ գորտի լյարդի արգինազի դեպքում ընդամենը 10%-ով, ինչը 2 անգամ ավելի ցածր է: Դեհլիզը և իր աշխատակիցները նույնպես նկարագրել են ցածր ջերմաստիճանի արգելակող ազդեցությունը առողջ մարդու թոքերի արգինազի ԷԴ-SU-ով ապասկտիվացման գործընթացի վրա [5]:

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

Ստացվել է 15.05.2012

## Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Месропян М.Б. Изоферменты аргиназы печени лягушек *Rana Ridibunda*. // 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., Sczzypec-Osiecka I., Zaleyska M., Porembaska Z. Purification and Some Properties of Human Heart Arginase. // Acta Biochem. Polon., 1980, v. 27, № 3–4, p. 181–189.
4. Dahlig E., Porembaska 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., Poremska Z., Mochnachka I.** Purification and Some Properties of Arginase from Human Lung. // Acta Biochim. Polon., 1975, v. 22, № 1, p. 77–85.
6. **Poremska 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 Diacetylmonooxine. // Anal. Biochem., 1970, v. 33, p. 263–272.
9. **Przylecki St.J., Opienska J., Giedroyc H.** La Degradation de l'Acide Urique Chez 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. Выявленные 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.