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

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

• Համառոտ հաղորդումներ • Краткие сообщения • Short communications •

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(66), 2014

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԹԹՎԱՅԻՆ ԻՆԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԵՎ ՀԵՏԱԳԱ ՌԵԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՎՐԱ

Թ.Ն. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Է.Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

Երևանի պետհամալսարան, կենսաքիմիայի ամբիոն
tamara.simonyan@gmail.com

Դարձելի ինակտիվացման ընթացքում ուսումնասիրվել են առնետի լյարդի արգինազի ֆերմենտային պատրաստուկների ակտիվության և ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխությունները: Քննարկվում է հիպոբարիկ հիպոքսիայի ժամանակ լյարդում ինդուկցված «ուղեկից» սպիտակուցների կարևոր դերը ակտիվության և ֆլուորեսցենտային հատկությունների վերականգնման համար:

Արգինազ – ինակտիվացում – ռեակտիվացում – ֆլուորեսցենցիա – հիպոբարիկ հիպոքսիա

В процессе обратимой кислотной инактивации проведено изучение аргиназной активности печени крыс и изменений интенсивности флуоресценции в соответствующих ферментных растворах. Обсуждается роль индуцируемых в печени при гипобарической гипоксии сопуствующих белковых фракций в восстановлении активности и флуоресцентных свойств изучаемого фермента.

Аргиназа – инактивация – реактивация – флуоресценция – гипобарическая гипоксия

Changes in activity and fluorescence of rat liver arginase during the reversible inactivation were studied. Obtained data revealed the role of guiding proteins, induced during the hypobaric hypoxia, in the reactivation and fluorescence of the enzyme.

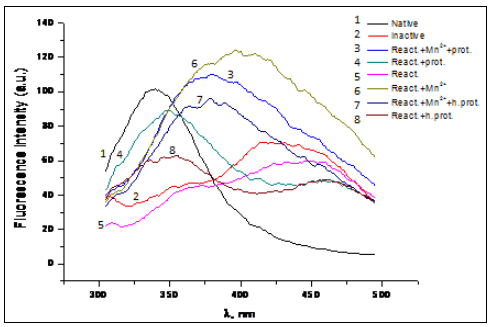
Arginase – inactivation – reactivation – fluorescence – hypobaric hypoxia

Աշխատանքում կատարվել են սպիտակ առնետի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազի թթվային միջավայրում (pH 3,6) ինակտիվացված և հետագայում տարբեր գործոնների ազդեցությամբ ռեակտիվացված ֆերմենտի համեմատական հետազոտություններ՝ նպատակ ունենալով բացահայտել այդ պրոցեսում ֆերմենտի մոլեկուլում ընթացող կոնֆորմացիոն փոփոխությունները: Ռեակտիվացումը իրականացվել է Mn^{2+} իոնների առկայությամբ և ժել-ֆիլտրացման ճանապարհով արգինազի մաքրման ընթացքում անջատված՝ 55000-71000 Դա մոլեկուլային զանգվածով «ուղեկից» սպիտակուցների ներկայությամբ: Ուսումնասիրվել է նաև ռեակտիվացման ընթացքում հիպոբարիկ հիպոքսիայի ենթարկված առնետների լյարդում ինդուկցված սպիտակուցների ազդեցությունն արգինազի ակտիվության և ֆլուորեսցենցիայի հատկությունների վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտման օբյեկտ են ծառայել լաբորատոր սպիտակ արու առնետները, 180-200 գ քաշով: Ֆերմենտի էքստրակտների ստացումը, մաքրումը, արգինազի ակտիվության և միզանյութի որոշումը, ինչպես նաև ուղեկցող սպիտակուցների անջատումը կատարվել է ավելի վաղ ներկայացված աշխատանքում [4] :

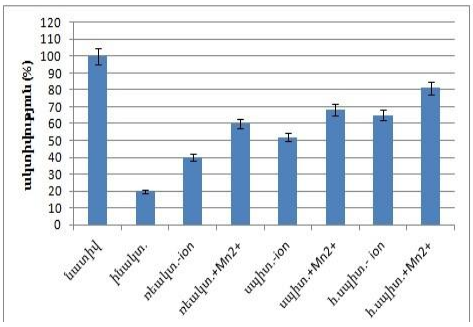
Ֆլուորեսցենտային չափումները կատարվել են Varian Cary Eclipse ֆլուորեսցենտային սպեկտրաֆոտոմետրի օգտագործմամբ՝ 1 սմ լայնությամբ կվարցե կյուվետներում: Գրգռման ալիքի երկարությունը ընտրվել է 280 նմ, իսկ առաքումը դիտարկվել է 300-500 նմ ալիքի երկարության տակ: Գրգռման և առաքման ճեղքերի լայնությունները եղել են համապատասխանաբար 5 և 10 նմ:

Արդյունքներ և քննարկում: Համաձայն ստացված արդյունքների նատիվ ֆերմենտի լուծույթներում (pH 7,4) գրգռման ալիքի 280 նմ երկարության դեպքում ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումը դիտվում է 335-340 նմ տիրույթում, իսկ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի կիսալայնքը կազմում է 48 նմ (նկ. 1), որը համընկնում է գրականության մեջ եղած և մեր լաբորատորիայում նախկինում ցուլի լյարդի արգինազի ֆլուորեսցենցիայի ստացված տվյալների հետ [2, 3]:



Նկ.1. pH 3,6 պայմաններում 12 ժ ինակտիվացված մասնակի մաքրված արգինազի pH 7,4 Tris-HCl բուֆերում 12 ժ վերականգնված նմուշների ֆլյուորեսցենտային սպեկտրները (λ= 280 nm)

Դա վկայում է այն մասին, որ ֆլուորեսցենցիան ապահովող տրիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդների հիմնական մասը գտնվում է մոլեկուլի հիդրոֆոբ հատվածում [1]: 12 ժ pH 3,6 պայմաններում ինկուբացնելիս առնետի լյարդի արգինազի մասնակի մաքրված ֆերմենտը գրեթե լրիվ կորցնում է ակտիվությունը (նկ. 2), իսկ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրը զգալի փոփոխության են ենթարկվում:



Նկ.2. Մասնակի մաքրված արգինազի pH 3,6 պայմաններում 12 ժ ինակտիվացված և pH 7,4 Tris-HCl բուֆերում 12 ժ վերականգնված նմուշների ակտիվությունը

Այդ պայմաններում արգինազի լուծույթների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը ընկնում է, իսկ մաքսիմումը շեղվում դեպի երկարալիք տիրույթ մինչև 450-480 նմ (նկ. 1): Թթվային միջավայրում ֆերմենտի այն հատվածներում, որտեղ տեղակայված են թիրոզինի և տրիպտոֆանի մնացորդները տեղի են ունենում կոնֆորմացիայի փոփոխություններ: Ըստ երևույթին, կատարվում է պոլիպեպտիդային շղթայի ապապարուրում, նշված ամինաթթվային մնացորդները տեղափոխվում են ավելի հիդրոֆիլային շրջապատ և առաջանում են ածանցյալներ, որոնց ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումը գտնվում է երկարալիք տիրույթում: Ինչպես երևում է նկ. 2-ից, 0,01 M Tris-HCl բուֆերում (pH 7,4), 12 ժ ռեկտիվացնելուց հետո արգինազի ակտիվությունը վերականգնվում է նատիվ ֆերմենտի ակտիվության 40 %-ի չափով, բայց ֆլուորեսցենցիայի պարամետրները զգալի փոփոխություններ չեն կրում: Դա վկայում է այն մասին, որ կոնֆորմացիոն փոփոխությունները, որոնք տեղի են ունենում մակրոմոլեկուլի քրոմոֆորներ տեղակայված հատվածներում, ուղղակիորեն կապված չեն ակտիվ կենտրոնի հետ:

Հետաքրքիր արդյունքներ են ստացվել, երբ ռեակտիվացիոն միջավայր ավելացվել են առնետի լյարդի էքստրակտներից ժել-ֆիլտրացման ճանապարհով առանձնացված ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաները: Այդ սպիտակուցների խառնուրդն ավելացնելու դեպքում ռեակտիվացման ցուցանիշները ավելի բարձր են՝ ակտիվությունը վերականգնվում է մինչև 52 % և 68 %, համապատասխանաբար Mn^{2+} իոնների բացակայությամբ և առկայությամբ (նկ. 2): Հավանաբար այդ սպիտակուցները մասամբ վերականգնում են մակրոմոլեկուլի նատիվ կառուցվածքը: Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների չափումները ցույց տվեցին, որ «ուղեկից» սպիտակուցների առկայության դեպքում կարևոր փոփոխություններ են տեղի ունենում նաև ֆերմենտի այն հատվածներում, որտեղ գտնվում են տրիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդները: Այդ սպիտակուցները փոխազդում են ոչ միայն ակտիվ կենտրոնի, այլ նաև արգինազի մոլեկուլի հիդրոֆոբային հատվածներում գտնվող ամինաթթվային մնացորդների հետ: Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության իջեցման հետ մեկտեղ, նկատելիորեն վերականգնվում է ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումը կարճալիք տիրույթում՝ 340-345 նմ (նկ.1): Կապվելով արգինազի մոլեկուլի հետ, այդ սպիտակուցները որոշ չափով վերականգնում են ինչպես ակտիվությունը, այնպես էլ արգինազի մոլեկուլի հիդրոֆոբ հատվածները՝ օժանդակելով ֆերմենտի կոնֆորմացիայի մասնակի վերականգնմանը և պարուրաձև ֆրագմենտների կազմավորմանը:

Մեր փորձերում ուսումնասիրվել է նաև հիպոբարիկ հիպոքսիայի ազդեցությանը ենթարկված կենդանիների լյարդում ինդուկցված ոչ արգինազային «ուղեկից» սպիտակուցների ազդեցությունը, որոնց քանակը այդ պայմաններում մոտ երկու անգամ ավելանում է: Այդ սպիտակուցների ավելացումը (pH 7,4) ռեակտիվացիայի ընթացքում բերում է ֆերմենտի ակտիվության վերականգմանը մինչև 65 % առանց Mn^{2+} իոնների և մինչև 81 % այդ իոնների ներկայությամբ: Այս դեպքում նույնպես տեղի է ունենում ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումի դիրքի տեղաշարժ դեպի կարճալիք տիրույթ (նկ. 1): Այսպիսով, հիպոբարիկ հիպոքսիայի ենթարկված առնետների լյարդում առաջացած ոչ արգինազային սպիտակուցների ներկայությամբ վերականգնվում է ֆերմենտի ակտիվությունը, որը կապված է ակտիվ կենտրոնի հետ, ինչպես նաև տեղի է ունենում ֆերմենտի կառուցվածքային որոշակի կարգավորում հիդրոֆոբ հատվածների շրջանում: Նշված պայմաններում «ուղեկից» սպիտակուցներն ունեն նկատելի կարգավորող՝ «շապերոնանման» ազդեցություն և,ամենայն հավանականությամբ, մտնում են «բազմաշապերոնային ցանցի» կազմի մեջ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Веденкина Н.С., Бурштейн Э.А.* Триптофанная флуоресценция белков в растворах, положение максимума спектров флуоресценции. Мол. Биол., *4*, в. 5, с.743-48, 1970.
2. *Геворкян М.Л., Давтян М.А.* Влияние ЭДТА и диализа на активность и флуоресценцию аргиназы печени быка. Биолог. журн. Армении, *58*, 1-2, 2006.
3. *Геворкян М.Л., Давтян М.А.* Изучение влияния pH и мочевины на флуоресценцию растворов аргиназы. Уч. записки ЕГУ, *3*, с. 3-9, 2002.
4. *Simonyan T.N.* Role of low-weight protein fractions in the process of reversible inactivation of white rat liver arginase, Proc. of the YSU, 1, p. 23-36, 2014.

Ստացվել է 24.01.2014