

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՎԹԱՆԴԻԼՅԱՆ ՆԻԿՈԼԱՅ ՎԼԱԴԻՄԻՐԻ

ՈՒՐԵՈՒԹԵԼԻԿ ԵՎ ՈՉ ՈՒՐԵՈՒԹԵԼԻԿ ԱՐԳԻՆԱԶՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ՊՈԼԻԱՄԻՆՆԵՐԻ
ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶՈՒՄ

Գ.00.04 - Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2013

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АВТАНДИЛЯН НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

РОЛЬ УРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ И НЕУРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ АРГИНАЗ В БИОСИНТЕЗЕ
ПОЛИАМИНОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 - Биохимия

Ереван 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝	ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր, Մ. Ա. Դավթյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Գ. Վ. Ապրիկյան կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ե. Գ. Բաղդասարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2013թ. հունիսի 4-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2013թ. մայիսի 4-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր	Լ. Հ. Նավասարդյան
--	-------------------

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.

Научный руководитель:	Академик НАН РА, доктор биол. наук, профессор М. А. Давтян
-----------------------	--

Официальные оппоненты:	доктор биол. наук, профессор Г. В. Априкян доктор биол. наук, профессор Е. Г. Багдасарян
------------------------	---

Ведущая организация:	Государственный аграрный университет Армении
----------------------	---

Защита диссертации состоится 4-го июня 2013г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 ВАК РА при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 4-го мая 2013 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051, доктор биол. наук, профессор	Л. А. Навасардян
--	------------------

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Պոլիամինները բջջի անփոխարինելի կոմպոնենտներ են, որոնք ունեն ազդեցության լայն սպեկտր [Pekka Kilpeläinen, 2002; Pegg AE, McCann PP, 1982; Pegg, A. E., Xiong, H., Feith, D. J. & Shantz, L. M. 1998]: Նրանց կենսասինթեզի նախանյութը L-օրնիթին ամինաթթուն է, որը առաջանում է L-արգինին ամինաթթվից արգինազ ֆերմենտի միջոցով [Давтян М. А., 1966, 1970; Cederbaum S. D. Et al., 2004; David E. Ash. 2004; Morris Jr., S.M.2009]: Օրնիթինից օրնիթինդեկաբոքսիլազի միջոցով սինթեզվում է պուտրեսցին պոլիամինը, որից հետո սպերմիդին և սպերմին սինթազների միջոցով այն վեր է ածվում սպերմիդինի և սպերմինի [Cuoyao W. U. et al., 1998; Mangold U. 2005; Kurt Racke et al., 2010]: Պոլիամինները հանդիպում են գրեթե բոլոր էուկարիոտների և պրոկարիոտների բջիջներում: Նրանք փոքր մոլեկուլային զանգված ունեցող միացություններ են, որոնք ունեն պոլիկատիոնային բնույթ, ինչն էլ պայմանավորում է նրանց կենսաբանական ազդեցության բազմազանությունը [Coleman C. S. 1996; Coffino P. 2001; Igarashi K. Et al., 2000; Kristina K. 2010]: Երկար ժամանակ պոլիամինների դերի և նշանակության մի շարք հարցեր մնում էին չպարզաբանված: Սակայն, վերջին տարիներին պարզվել է, որ պոլիամինները, որոնցից գլխավորապես տարածված են պուտրեսցինը, սպերմիդինը և սպերմինը, մասնակցում են ԴՆԹ-ի և ԻՐՆԹ-ի կառուցվածքի կայունացմանը, տրանսկրիպցիոն և տրանսլյացիոն պրոցեսներին, ապոպտոզին, քրոմատինի կառուցվածքի մոդուլյացիային, ռեցեպտոր-լիգանդ փոխազդեցությանը, ազդանշանի փոխանցմանը, իոնային անցուղիների աշխատանքին, բջջի շարժունությանը, մեմբրանի կայունությանը, բջջի աճին, դիֆերենցացիային և պրոլիֆերացիային [Kuiper M. A. 2000; Lange P. S. et al., 2004; Bachrach U. 2001; Bachetti T. 2004; Cai D. Et al., 2002; Camon L. 2001; Casti A. et al., 1997; Celano P. et al., 1989; Dagostino et al., 2002; Deignan J. L. et al., 2008; Devens B. H. Et al., 2000; Filbin M. T. 2003; Gerner E. W. 2004; Liu L. 2003, 2005; Jian-Ying Wang and Robert A. Casero Jr. 2006]: Նշված բոլոր պրոցեսները անքակտելի են բջջի բնականոն կենսագործունեությունից, ինչը պոլիամիններին դարձնում է բջջի անփոխարինելի մետաբոլիտներ: Այնուամենայնիվ պոլիամինների կենսասինթեզի մեխանիզմի վերաբերյալ կան չպարզաբանված կողմեր: Մասնավորապես պարզաբանված չէ այն հարցը, թե որ արգինազն է մասնակցում պոլիամինների կենսասինթեզի պրոցեսում: Հայտնի է, որ ակադեմիկոս Մ. Ա. Դավթյանի և իր կողմից ղեկավարվող լաբորատորիայի աշխատանքների, ինչպես նաև գրականության խորը վերլուծության արդյունքում եզրակացվել է, որ բնության մեջ գոյություն ունեն արգինազի երկու իզոմերներ [Давтян М. А. и др. 1967, 1970, 2005]: Մեկը՝ ուրեդոթելիկ արգինազը, որը հանդիպում է ուրեդոթելիկ օրգանիզմների լյարդում և հանդիսանում է ամոնիակի չեզոքացման գլխավոր մեխանիզմի՝ օրնիթինային ցիկլի վերջին ֆերմենտը, մյուսը՝ ոչ ուրեդոթելիկ արգինազը, ունի լայն կենսաբանական տարածվածություն, այն ներկայացված է գրեթե բոլոր օրգանիզմներում և հյուսվածքներում, չի մասնակցում ամոնիակի չեզոքացման մեխանիզմներին և ունի յուրահատուկ դեր բջջի մետաբոլիզմում (Давтян М. А., 1967; 1968; Давтян М. А. и др., 1982; Buniatian H. Ch. and Davtian M. A., 1966): Մասնավորապես, եզրակացվեց, որ, ոչ ուրեդոթելիկ արգինազը մի կողմից ներգրավում է արգինինի ածխաջրածնային կմախքը պրոլինի, պոլիամինների, գլուտամատի կենսասինթեզում՝ ապահովելով վերջիններիս կենսասինթեզի պրոցեսները արգինինի հիդրոլիզի հետևանքով առաջացած օրնիթինով, մյուս կողմից սահմանափակում է արգինինի

ներգրավման հնարավորությունները NO-ի կենսասինթեզում, միատեղակալված գուանիդինային միացություններում (ինչպիսին է գլիկոցիամինը), ինչպես նաև հիստոնների արգինինով հարուստ ֆրակցիաներում: Մեր լաբորատորիայի հետազա հետազոտություններում հաստատվեց այն գաղափարը, որ ոչ ուրեթեյիկ արգինազը հիդրոլիզելով արգինինը մատակարարում է պրոլինի կենսասինթեզը օրնիթինով [Агаджанян А. X. 1975, 1980; Давтян М. А. 1975]: Ներկայումս մեր առաջ խնդիր է դրվել պարզաբանել պոլիամինների կենսասինթեզում մասնակցող արգինազի բնույթը (ուրեթեյիկ, թե ոչ ուրեթեյիկ): Պոլիամինների կենսասինթեզի նկատմամբ հետաքրքրությունը մեծացել է վերջին տարիներին՝ կապված բջջում ընթացող բնականոն և պաթոլոգիկ պրոցեսներին պոլիամինների մասնակցության նոր կողմերի բացահայտմամբ (Wallace HM. 1996; Thomas, T. and Thomas, T. J. 2001; Sawanya Buranaphalin, 2009; Philip Coffino, 2001; Palanimurugan R, Scheel H, Hofmann K, Dohmen RJ. 2004; Oredsson, S. M. 2003; Kristiina Kanerva, 2010): Մասնավորապես պոլիամինները հանդես են գալիս ազդանշանի փոխանցման գործընթացում ռեցեպտոր-լիգանդ փոխազդեցության և իոնային անցուղիների կայունացնողներ, ապահովում են ԴՆԹ-ի աջապտույտ B ձևի անցումը ձախատույտ Z ձևի (Dagostino et al., 2005; 2006), կորիզի նուկլեոմներում առաջացնում են պոլիամինային կորիզային ագրեգատներ, որոնք կապվում են գենոմիկ ԴՆԹ-ի հետ և ապահովում սպիտակուց-ԴՆԹ փոխազդեցությունները (Eisenberg et al., 2009), ընկճում կամ բարձրացնում են հիստոնների ացետիլացումը, ազդում են Օկազակիի հատվածների վրա՝ խթանելով մեծ քանակով ԴՆԹ-ի սինթեզը (Johansson et al., 2008), կապվում են ԱԵՖ-ի հետ՝ ազդելով նրա մասնակցությամբ ընթացող բազմաթիվ ֆերմենտատիվ պրոցեսների վրա (Maruyoshi et al., 2009), մոդուլյացնում են սպիտակուց-սպիտակուց (լիգանդ-ռեցեպտոր) էլեկտրոստատիկ փոխազդեցություններ (Berwanger et al., 2009), հանդես են գալիս որպես բջջի աճի ֆակտոր աուտոֆունու հիվանդությունների և քաղցկեղի ժամանակ (Wallace et al., 2004; Roy et al., 2008; Forshel et al., 2010):

Կենսաքիմիայի մաթիոնի նախորդ աշխատանքներում մանրամասնությամբ ուսումնասարվել է նշված երկու արգինազների բազմաթիվ ֆիզիկոքիմիական հատկություններ (Km, Ki, Mn^{2+} իոնների ակտիվացնող ազդեցության, մոլեկուլյար կշիռների, հորմոնալ և սուբստրատային ինդուկցիայի հնարավորությունները, ակտիվ կենտրոնում հիստիդինի նշանակությունը և այլն), որոնք անկասկած հանդիսանում են գենետիկորեն պայմանավորված տարբերություններ [Давтян и др. 1970, 2005]: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ ոչ ուրեթեյիկ արգինազի Km-ը զգալի բարձր է ուրեթեյիկ արգինազի Km-ից, ուրեթեյիկ արգինազի մոլեկուլյար կշիռը շուրջ 110-120 կԴԱ, իսկ ոչ ուրեթեյիկինը՝ զգալի բարձր կամ ցածր: Ուրեթեյիկ արգինազը տրիմեր է, ունի ցիտոզոլային լոկալիզացիա և ի տարբերություն մյուս իզոմերի օժտված է իրեն յուրահատուկ սուբստրատային ինդուկցիայի ենթարկվելու կարողությամբ: Ոչ ուրեթեյիկ արգինազը կարող է լինել անգամ օկտամեր և ունի միտոքոնդրիալ լոկալիզացիա: Ներկայումս հաստատված է, որ գոյություն ունեն ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների տարբեր գեներ: Պետք է նշել, որ պոլիամինների հետ առնչվող արգինազի բնույթի մասին գրականության տվյալները սակավաթիվ են, ունեն բացթողումներ և շատ դեպքերում հակասական բնույթ: Չնայած տպագրված մի շարք գիտական հոդվածների, որոնք վերաբերվում են պոլիամինների և արգինազի փոխհարաբերություններին, դեռ բացահայտված չէ արգինազի այն իզոֆերմենտը, որը

օրնիթին է մատակարարում պոլիամինների կենսասինթեզի համար (Joshua L. Deignan et al., 2007; Hui Li et al., 2001; Gopalakrishna R. and Nagarajan B. 1980; Deignan JL, Livesay JC, Yoo PK, Goodman SI, O'Brien WE, Iyer RK, Cederbaum SD, Grody WW. 2006): Ատենախոսության մեջ կպարզաբանվեն ինչպես արգինազի իզոֆերմենտների վրա պոլիամինների ազդեցության, այնպես էլ պոլիամինների կենսասինթեզում օրնիթինի աղբյուրի բացահայտման նորագույն ասպեկտներ:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Մեր առջև խնդիր էր դրված պարզաբանել ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների մասնակցությունը պոլիամինների կենսասինթեզում: Մենք ենթադրում ենք, որ պոլիամինների կենսասինթեզի օրնիթինը առաջանում է ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ազդեցությամբ, մինչդեռ ուրեթեյիկ արգինազը օրնիթին է տրամադրում միզանյութի սինթեզի համար: Ատենախոսության նպատակն է փորձարարական հաստատում տալ մեր կողմից առաջ քաշված վերոնշյալ ենթադրությանը: Նշվածը բացահայտելու համար հետազոտությունները տարվել են հետևյալ ուղղություններով՝

- որոշվել է հաջորդաբար հել-ֆիլտրացիոն (սեֆադեքս G-100) և իոնափոխանակային (CM-ցելյուլոզ) քրոմատոգրաֆիայի եղանակով արգինազի իզոֆերմենտային սպեկտրը առնետների տարբեր օրգաններում:
- հետազոտվել է *in vitro* պայմաններում յուրաքանչյուր պոլիամինի (պուտրեցին, սպերմիդին և սպերմին) ազդեցությունը արգինազի իզոֆերմենտների ակտիվության վրա:
- ուսումնասիրվել է էնդոգեն և էկզոգեն պոլիամինների խառնուրդների ազդեցությունը ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվությունների վրա առնետի տարբեր օրգաններում:
- պոլիամինների առկայության և բացակայության պայմաններում որոշվել է արգինազի իզոֆերմենտների ակտիվության կախվածությունը L-արգինինի տարբեր կոնցենտրացիաներից:
- Պարզաբանվել է պոլիամինների ազդեցության բնույթը և մեխանիզմները Լայնուիվեր-Բերկի և Միխայելիս-Մենտենի կորագծերի և հավասարումների միջոցով:
- հետազոտվել է գլխուղեղի, լյարդի, երիկամների պոլիամինների քանակական կապը ՈՌԻԱ-ի ակտիվության հետ:
- բացահայտվել է պոլիամինների խառնուրդի ներերակային ներարկումից 12 և 24 ժամ հետո արգինազի իզոֆերմենտների ակտիվությունների փոփոխությունները հոմոգենատներում և սեֆադեքս G-100-ով հել-ֆիլտրացիայից հետո:

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը: Առաջին անգամ պարզաբանվել է պոլիամինների ազդեցությունը արգինազի իզոֆերմենտների վրա: Բացահայտվել է, որ պոլիամինները արգելակում են միայն ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվությունը: Արգելակման բնույթի և մեխանիզմների ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին պոլիամինների խառնուրդի և առանձին պոլիամինների ոչ մրցակցային արգելակիչ լինելու հանգամանքը, որը անժխտելի ապացույց է պոլիամինների կենսասինթեզում ոչ ուրեթեյիկ արգինազի մասնակցության մասին: Ոչ ուրեթեյիկ արգինազի նորագույն ֆունկցիան է պոլիամինների կենսասինթեզի կարգավորմանը մասնակցելը:

Ատենախոսությունը բացի հիմնարար արժեքից, ունի նաև կիրառական նշանակություն: Ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվության փոփոխությունը պաթոլոգիկ

վիճակներում (հիմնականում՝ քաղցկեղ, նեյրոդեգեներատիվ, աուտոիմուն և վիրուսային հիվանդություններ) կարող է փոփոխել պոլիամինների քանակությունը՝ այդպիսով իսկ ազդելով հիվանդության ընթացքի վրա: Մասնավորապես, ՕԴԿ-ի ակտիվության բարձրացումը և պոլիամինների քանակի աճը քաղցկեղի ժամանակ, որտեղ պոլիամինները հանդես են գալիս որպես աճի ֆակտոր, կարելի է կանխել ոչ ուրեթթելիկ արգինազի արգելակման միջոցով: Միևնույն ժամանակ կենտրոնական նյարդային համակարգի նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների ժամանակ պոլիամինների (պահպանում են պոտենցիալների տարբերությունը, մասնակցում են նեյրոմեդիատորների կենսասինթեզին և նեյրոնների վերականգնմանը) քանակի նվազումը կարելի է կանխարգելել ոչ ուրեթթելիկ արգինազի հորմոնալ և ոչ հորմոնալ ինդուկցիայի միջոցով: Ստացված տվյալները անկասկած հիմք կհանդիսանան պոլիամիններով բուժման նպատակով համապատասխան դեղամիջոցների սինթեզով զբաղվողների համար:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում: Ստացված արդյունքները ներկայացվել են հետևյալ գիտաժողովներում՝ “16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых”, г. Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года; “School of Protein Science: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules”, Sofia, Bulgaria, September 9-14, 2012; “Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology 3”, Yerevan, Armenia, 26-29 September 2012; “17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых”, г. Пушино, 22 - 26 апреля 2013 года: Ատենախոսության թեմայով հրատարակված է 3 հոդված և գիտաժողովների 3 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից, ամփոփումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 135 էջերում, պարունակում է 24 աղյուսակ և 22 գծապատկեր:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտման օբյեկտ: Հետազոտման օբյեկտ է ծառայել լաբորատոր սպիտակ արու առնետը՝ 180-200 գ. զանգվածով: Առնետները պահվել են 18-23°C, 12/12ժ գիշեր/ցերեկ հարաբերությամբ, ստանդարտ սննդակարգով: Փորձարարական աշխատանքների համար օգտագործվել են յարդը, երիկամները և գլխուղեղը:

Արգինազի իզոֆերմենտների անջատում և մաքրում: Օգտագործվել է Կոսսմանի մեթոդը (1966). Սեֆալեքս G-100-ով լցված աշտարակով (2,5×50սմ, ֆոսֆատային բուֆեր, pH-7.2) անցկացվել է առնետի լյարդի (0,5%), գլխուղեղի (10%) և երիկամների (10%) հոմոգենատների (0,2M գլիցինային բուֆերում (pH-9.5)) վերնստվածքները, որոնք ստացվել են ցենտրիֆուգումից հետո՝ 1500g 10րոպե 0-4°C (ՈՒՐ-1): Հավաքվել է 40 ֆրակցիա: Հել-ֆիլտրացիայի միջոցով ստացված արգինազ պարունակող ֆրակցիաները անցկացվել են ԿՄ-ցելյուլոզով (1,5×35սմ): Գրադիենտային էլյուցիան կատարվել է KCl-ի 0,05M, 0,1M, 0,15M, 0,2M և 0,25M լուծույթներով: Հավաքվել է 32 ֆրակցիա՝ 4-ական մլ:

Արգինազի ակտիվության որոշման կոլորիմետրիկ մեթոդ: Պատրաստվել է առնետի լյարդի (0,05%), գլխուղեղի (10%) և երիկամների (10%) հոմոգենատներ [Rathner S., Pappas A., 1949]: Ցենտրիֆուգվել է 3000ստ/ր 10րոպե 0-4°C: Փորձանոթում ավելացվել է 1.5մլ

գլիցինային բուֆեր, 0.5մլ վերնստվածք, 0.2մլ $MnCl_2 \times 4H_2O$, 0.4մլ L-արգինին, որից հետո ինկուբացվել է 37°C 60 րոպե: Կատալիզը դադարեցվել է 1մլ 20% ԵՔՔ-ով: 5000պո/ր 10րոպե ցենտրիֆուգելուց հետո անջատված վերնստվածքում որոշվել է միզանյութը [Archibald 1949]: Փորձանոթների մեջ ավելացվել է 2.5մլ թթվային խառնուրդ, 1մլ վերնստվածք, 0.2մլ 3% ԴԱՄՕ, դրվել է ջրային բաղնիքում 45 րոպե: Ստացված գույնի ինտենսիվությունը չափվել է 487նմ երկարության ալիքի տակ (Genesys 10, Thermo Scientific, USA): Ֆերմենտի ակտիվությունը գնահատվել է անջատված միզանյութի միկրոմոլերով՝ 1գ թաց հյուսվածքին համապատասխան:

Պոլիամինների ներերակային ներարկում: Առնետները բաժանվել են չորս խմբի [Annelis H. et al., 1998; Kari Jones 2012]՝

1. ստուգիչ խմբի առնետներին ներարկում չի կատարվել, որոշվել է արգինազի ակտիվությունը նորմայում: Առնետների զանգվածը կազմել է 180-200գ:
2. Մինչ փորձարարական խմբերին ներարկելը, կատարվել է միայն 0,5մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթի ներարկում:
3. 50մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում: Օգտագործվել են պուտրեցին՝ 2.2 մգ, սպերմիդին՝ 4 մգ, սպերմին 5 մգ պոլիամինների խառնուրդ լուծված 0,5մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթում (25 մկմոլ քանակով):
4. 100 մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում: Այս դեպքում խառնուրդի պատրաստման համար օգտագործվել են պուտրեցին՝ 4.4մգ, սպերմիդին՝ 8 մգ և սպերմին 10 մգ պոլիամինները (յուրաքանչյուրը 50 մկՄ քանակով):

Էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդի պատրաստում: Օրգանները հոմոգենիզացվել են 5%-ոց $HClO_4$ -ի սառը լուծույթում՝ 100 մգ/մլ հարաբերակցությամբ: +4°C-ում 1 օր էքստրակցիայից հետո, փորձանմուշները ցենտրիֆուգվել են 15.000g x 20 րոպե +4°C-ում [Seiler N. 1970]:

Պոլիամինների քանակության որոշում նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի միջոցով: Վերնստվածքի պոլիամինները որոշվել են Մելլերի (1970) և Խանի (2006) մեթոդով: 200 մկլ $HClO_4$ -ի էքստրակտին ավելացվել է 400 մկլ դենսիթրոմիդի լուծույթ (5մգ/մլ ագետոն) և 200 մկլ 0.2Մ Na_2CO_3 : Լուծույթը ինկուբացվել է ողջ գիշեր: Ռեակցիան կանգնեցվել է 100 մկլ պրոլինի լուծույթով (100մգ/մլ) և ինկուբացվել 30 րոպե: Դենսիլպոլիամինները էքստրակցիայի են ենթարկվել 0.5մլ էթիլացետատով և խառնվել 30 վայրկյան: Ստանդարտը պատրաստվել է նույն ձևով՝ յուրաքանչյուրից վերցնելով 10-50 նՄ: 50 մկլ դենսիլպոլիամինը ավելացվում է թիթեղիկների (ITCX-AՓ-B, սիլիկազել KCKF, ՌԴ) նախաադորբցիոն հատվածին: Օգտագործվել է քլորոֆորմ/տրիէթիլամին (25/2, V/V) շարժուն ֆազը: Կետերը երևակվել են մթության մեջ՝ օդի թույլ հոսքով: Դեղնաշագանակագույն կետերը լուծվել են 2մլ էթիլացետատի մեջ: Պոլիամինների քանակությունը որոշվում է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 505 նմ երկարության ալիքի տակ (Genesys 10, Thermo Scientific, USA): RF արժեքները որոշվել են կետի թռիչքի երկարություն և ֆազի թռիչքի երկարությամբ:

Արգելակման բնույթի որոշում Լայնուիվեր-Բերկի կորագծերի միջոցով: Արգելակման մեխանիզմը պարզելու համար ուսումնասիրվել է ֆերմենտատիվ ռեակցիայի արագության կախումը արգինինի (10, 50, 100, 150, 250, 300 և 500 մկմոլ) տարբեր կոնցենտրացիաներից՝ պոլիամինների առկայությամբ և բացակայությամբ: Լայնուիվեր-Բերկի հակադարձ մեծություններ գրաֆիկների միջոցով պարզվել է ինչպես արգինազնրի արգելակման մեխանիզմը, այնպես էլ K_m , V_{max} , K_i ֆերմենտատիվ

ռեակցիայի հաստատունները [David L. Nelson, Michael M. Cox. 2002; David E. Metzler. 2007];

Ստացված արդյունքների մշակում Statistica 10 (StatSoft) ծրագրով: Ստացված արդյունքները ներկայացված են միջին±ստանդարտ շեղում արժեքներով: Էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդի ազդեցությունը տարբեր օրգանների հոմոգենատների արգինազների վրա, պուտրեսցինի, սպերմիդինի, սպերմինի, էկզոգեն և էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդի ազդեցությունը մասնակի մաքրված (Մեֆադեքս G-100 և ԿՄ-ցելյուլոզ) ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների վրա մշակված է Statistica 10 ծրագրով: Արդյունքները անալիզի են ենթարկվել Student t-test-ի (single sample) միջոցով:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Էնդոգեն պոլիամինների ազդեցությունը առնետի տարբեր օրգանների հոմոգենատների արգինազների ակտիվության վրա

Ելնելով այն տրամաբանությունից, որ պոլիամինները արգինազի կենսասինթետիկ ուղղու վերջին պրոդուկտներն են, ապա պետք է արգելակեն այն արգինազին, որը մասնակցում է պոլիամինների կենսասինթեզին (ուրեթեյիկ, թե ոչ ուրեթեյիկ): Նախ և առաջ մեր կողմից պարզաբանվել է թե պոլիամինները ինչպես են ազդում տարբեր օրգանների գոմարային արգինազի ակտիվության վրա:

Աղյուսակ 1. Էնդոգեն պոլիամինների ազդեցությունը տարբեր հյուսվածքների հոմոգենատների արգինազի ակտիվության վրա, Ա – արգինազ, ՊԱ – պոլիամին, * - 1մլ խառնուրդը պարունակում է 156 մկգ պոլիամինների խառնուրդ, n=10, p<0,001.

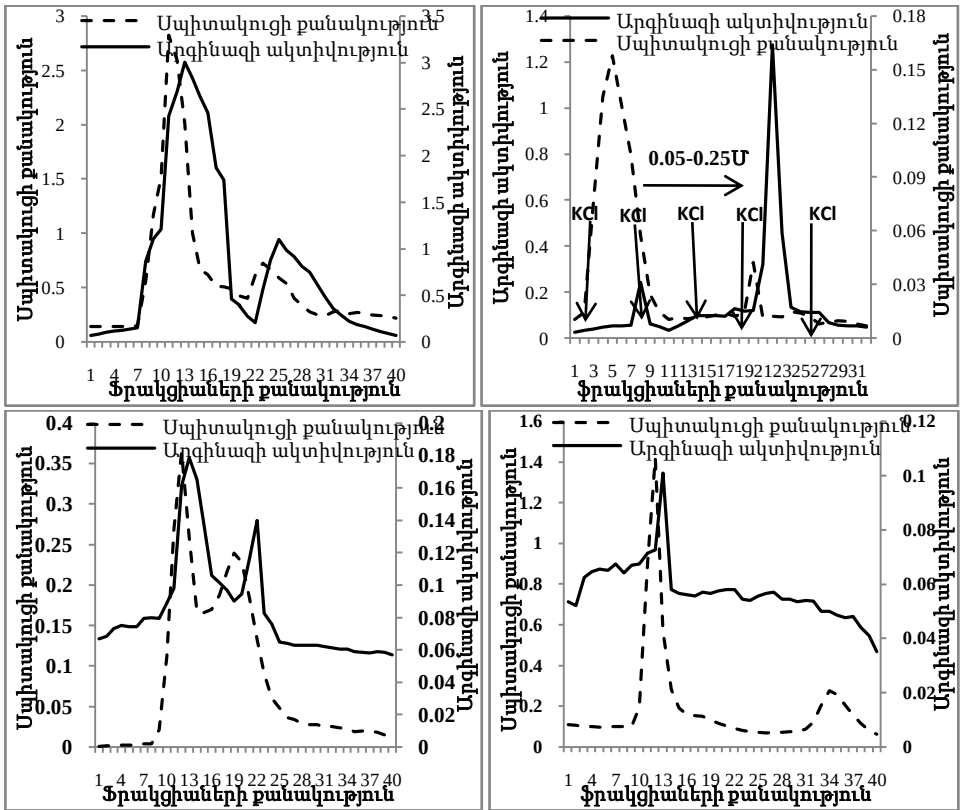
Օրգաններ	Արգինազ+ՊԱ	M±SD մկմոլ միզանյութ/1գ. հյուսվածք	Արգելակում %
Լյարդ	Արգինազ	7594,8±765,4	-
	Արգ+0.5մլ ՊԱ*	7120,7±409,2	6,3
	Արգ+1մլ ՊԱ	6983,1±916,6	8,1
	Արգ+1.5մլ ՊԱ	6383,6±693,1	15,9
	Արգ+2մլ ՊԱ	6175,8±544,1	18,7
Երիկամ	Արգինազ	356,3±34,4	-
	Ա+0.5մլ ՊԱ	337±56,8	5,4
	Ա+1մլ ՊԱ	303,9±32,5	14,7
	Ա+1,5մլ ՊԱ	285±48,4	20,1
	Ա+2մլ ՊԱ	263,9±25,1	26,1
Գլխուղեղ	Արգինազ	92,8±10,7	-
	Ա+0.5մլ ՊԱ	81,6±2,3	12,1
	Ա+1մլ ՊԱ	71,9±5,4	22,53
	Ա+1,5մլ ՊԱ	62±2,7	33,2
	Ա+2մլ ՊԱ	58±1,8	34,8

Ինչպես տեսնում ենք ստացված արդյունքներից (աղյուսակ 1) 0,5-2մլ պոլիամինների խառնուրդը արգելակում է լյարդի, գլխուղեղի, երիկամների հոմոգենատների արգինազների ակտիվությունը: Հատկանշական է այն, որ պոլիամինների խառնուրդի քանակության ավելացմամբ մեծանում է արգինազի ակտիվության արգելակման չափը: Պետք է նկատել, որ երիկամների (2մլ՝ 26,1 %) և

գլխուղեղի (2մլ՝ 34,8 %) արգինազները արգելակվում են ավելի մեծ չափով, քան լյարդի արգինազը (2մլ՝ 18,7 %): Ստացված արդյունքները արդեն իսկ ցուցադրում են արգինազի ակտիվության անկում պոլիամինների ազդեցությամբ:

Պուտրեսցինի, սպերմիդինի, սպերմինի ազդեցությունը մասնակի մաքրված լյարդի, երիկամների և գլխուղեղի արգինազների իզոենզիմների ակտիվության վրա

Նախքան լյարդի ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ, գլխուղեղի և երիկամների ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվության փոփոխության ուսումնասիրումը պոլիամինների ազդեցությամբ, մեր կողմից կատարվել է արգինազի իզոֆերմենտների ֆրակցիոնացում նշված օրգանների հոմոգենատներից: Պատրաստվել է լյարդի 0,1%-ոց, երիկամների և գլխուղեղի 10%-ոց հոմոգենատներ: Սեֆադեքս G-100-ով հել-ֆիլտրացիայից հետո լյարդի սպիտակուցային և արգինազային ակտիվության սպեկտրը ներկայանում է երկու գագաթներով՝ 13 և 25 ֆրակցիաներում (զծ. 1, վերևի ձախ): Մեր լաբորատորիայի նախկին աշխատանքներում՝ հաշվի առնելով մի շարք հատկություններ (K_m , Mn^{2+} -ի ազդեցություն, մոլեկուլային զանգված, ներքջային տեղադրվածություն, հորմոնալ ինդուկցիա), ցույց է տրվել ֆրակցիաներում պարունակվող արգինազի բնույթը [Давтян М. А. 1970]: 13-րդ ֆրակցիայում պարունակվող իզոֆերմենտը ուրեթեյիկ արգինազն է, իսկ 25-րդ ֆրակցիայում ներկայացված է ոչ ուրեթեյիկ իզոնը: Այնուհետև կատարվել է լյարդի բարձրամոլեկուլային իզոենզիմի ֆրակցիոնացիա CM-ցելյուլոզով (զծ. 1, վերևի աջ): Իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացվում է արգինազի երկու գագաթ՝ համապատասխանաբար 8-րդ և 21-րդ ֆրակցիաները: 8-րդ ֆրակցիան պարունակում է արգինազի ոչ ուրեթեյիկ իզոենզիմ, իսկ 21-րդը՝ ուրեթեյիկ իզոնը: Համաձայն գրականության տվյալների և մեր լաբորատորիայում Մ. Ա. Դավթյանի կողմից ստացված փորձարարական արդյունքների, երիկամներում և գլխուղեղում պարունակվում է արգինազի միայն ոչ ուրեթեյիկ իզոնը: Երիկամների հոմոգենատի հել-ֆիլտրացիայից հետո ստացվում է սպիտակուցի և արգինազի ակտիվության 2-ական գագաթ: Երիկամի ոչ ուրեթեյիկ արգինազը ներկայացված է 13 և 22 ֆրակցիաներում (զծ. 1, ներքևի ձախ): Գլխուղեղի հոմոգենատի Սեֆադեքս G-100-ով ֆրակցիոնացման ընթացքում ստացվում է սպիտակուցի 2 գագաթ, իսկ արգինազի ակտիվության 1՝ 14-րդ ֆրակցիայում (զծ. 1, ներքևի աջ): Փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ յուրաքանչյուր առանձին պոլիամինի դեպքում և խառնուրդի ժամանակ դիտվում է ինչպես բարձրամոլեկուլային, այնպես էլ ցածրամոլեկուլային ֆրակցիաների արգինազների ակտիվության արգելակում (աղյուսակ 2, 3): Վերլուծելով ստացված արդյունքները, պարզվում է, որ լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի դեպքում նկատվում է ակտիվության թույլ արգելակում: Լյարդի հոմոգենատի Սեֆադեքս G-100-ով հել-ֆիլտրացիայից հետո ստացված բարձրամոլեկուլային ֆրակցիայի արգինազը, որը պարունակում է ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ իզոնները, արգելակվում է 2,4-12,2%-ի չափով: Լյարդի հոմոգենատի բարձրամոլեկուլային ֆրակցիայի իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացված 21-րդ ֆրակցիայի ուրեթեյիկ արգինազը պոլիամինների տարբեր քանակների ազդեցությամբ արգելակվում է ընդամենը 0,4-2,8%-ի չափով: Հել-ֆիլտրացիայից և իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացված լյարդի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ֆրակցիաներին պոլիամինների խառնուրդի ավելացումը բերում է արգինազի ակտիվության 10,3-13,6% արգելակման:



Գծապատկեր 1. Առնետի լյարդի (վերևի), երիկամի և գլխուղեղի (ներքևի ձախ և աջ) արգինազի իզոէլեկտրաֆորեզի արգինազի, $n=6$, $p<0,05$; լյարդի ոչ ուրեթթելի արգինազը ներկայացված է 25-րդ ֆրակցիայում հել-ֆիլտրացիայից հետո և 8-րդ՝ իոնափոխանակային բրոմատոգրաֆիայից հետո, երիկամի ոչ ուրեթթելի արգինազը՝ 13 և 22 ֆրակցիաներում, գլխուղեղինը՝ 14-րդ:

Պուտրեցինի ազդեցությամբ արգելակումը կազմում է 16-18,8%, սպերմիդինի ազդեցությամբ՝ 13,2-14,8%, իսկ սպերմինի դեպքում՝ 7,9-24%: Աղյուսակ 3-ում ներկայացված է պոլիամինների ազդեցության արդյունքները երիկամների և գլխուղեղի ոչ ուրեթթելի արգինազի ակտիվության վրա: Երիկամի 13-րդ (22) ֆրակցիայի ոչ ուրեթթելի արգինազի ինկուբացիոն միջավայր պուտրեցինի 88մկգ՝ 1մկմոլ, և 176 մկգ՝ 2մկմոլ-ի ավելացումը բերում է համապատասխանաբար 4,6 և 7,4% (3,7 և 9,3%) արգելակման, սպերմիդինի 145 և 290 մկգ-ի ավելացումը՝ 1,7 և 3% (4,5 և 5,6%) արգելակման, սպերմինի 202 և 404 մկգ-ի ավելացումը՝ 2,2 և 4,6% (3 և 9,3%) արգելակման, իսկ պոլիամինների խառնուրդի 1 և 2 մկՄ-ի ավելացումը՝ 11,1 և 14,6% (10 և 13%) արգելակման: Գլխուղեղի ոչ ուրեթթելի արգինազի ակտիվության արգելակումը ավելի բարձր է, քան երիկամի երկու իզոֆերմենտներ դեպքում: Վերոնշյալ քանակներով պոլիամինների և պոլիամինների խառնուրդի ավելացումը ՈՌԻԱ-ի ինկուբացիոն միջավայր, արգելակում է վերջինիս ակտիվությունը 10-15,9%-ով:

Աղյուսակ 2. Առանձին պոլիամինների ազդեցությունը լյարդի ուրեթերիկ և ոչ ուրեթերիկ արգինազների վրա, n=6, p<0,05; Արգ. – արգինազ, Պուտ1 – 88 մկգ պուտրեսցին, Պուտ2 – 176 մկգ, Սպդ1 – 145մկգ սպերմիդին, Սպդ2 – 290մկգ, Սպմ1 – 202մկգ սպերմին, Սպմ2 – 404մկգ լուծված 1 մլ գլիցինադին բուֆերում՝ pH-9,5:

Լյարդի արգինազի իզոֆերմենտ	Պոլիամիններ	մկմոլ միզանյութ/1ֆրակցիա/1մլ	Արգելակում %
Լյարդի ուրեթերիկ արգինազ (ՌԻԱ), 13-րդ ֆրակցիա, Սեֆադեքս G-100	Արգ.	0,82±0,23	-
	Պուտ1	0,77±0,21	6,1
	Պուտ2	0,75±0,22	8,5
	Սպդ1	0,80±0,2	2,4
	Սպդ2	0,79±0,15	3,6
	Սպմ1	0,72±0,17	12,2
	Սպմ2	0,7±0,18	14,6
	ՊԱ1	0,735±0,20	10,3
Լյարդի ուրեթերիկ արգինազ, 21-րդ ֆրակցիա, ԿՄ-ցելյուլոզ	Արգ.	0,36±0,028	-
	Պուտ1	0,355±0,027	1,4
	Պուտ2	0,351±0,024	2,5
	Սպդ1	0,359±0,018	0,35
	Սպդ2	0,358±0,024	0,4
	Սպմ1	0,352±0,031	2,2
	Սպմ2	0,350±0,014	2,8
	ՊԱ1	0,354±0,025	1,7
Լյարդի ոչ ուրեթերիկ արգինազի 1-ին իզոֆերմենտ, 25-րդ ֆրակցիա, Սեֆադեքս G-100	Արգ.	0,265±0,0275	-
	Պուտ1	0,22±0,021	16,9
	Պուտ2	0,215±0,02	18,8
	Սպդ1	0,23±0,017	13,2
	Սպդ2	0,227±0,023	14,3
	Սպմ1	0,244±0,0275	7,9
	Սպմ2	0,243±0,0226	8,3
	ՊԱ1	0,236±0,0289	10,9
Լյարդի ոչ ուրեթերիկ արգինազի 2-րդ իզոֆերմենտ, 8-րդ ֆրակցիա, ԿՄ-ցելյուլոզ	Արգ.	0,075±0,0047	-
	Պուտ1	0,063±0,0028	16
	Պուտ2	0,061±0,0039	18,7
	Սպդ1	0,065±0,0047	13,3
	Սպդ2	0,064±0,0085	14,8
	Սպմ1	0,059±0,0047	21,3
	Սպմ2	0,057±0,0029	24
	ՊԱ1	0,067±0,0054	11
	ՊԱ2	0,065±0,0068	13,3

ՊԱ	ԵՈՌԻԱ1, մկմոլ միզանյութ/1 ֆրակցիա/մլ	Սրգելակում %	ԵՈՌԻԱ2, մկՄ միզանյութ/1 ֆրակցիա/մլ	Սրգելակում %	ԳՈՌԻԱ, մկՄ միզանյութ/1 ֆրակցիա/մլ	Սրգելակում %
ՈՌԻԱ	0,46±0,1	-	0,269±0,018	-	0,189±0,013	-
Պուտ1	0,439±0,096	4,6	0,259±0,026	3,7	0,17±0,011	10
Պուտ2	0,426±0,083	7,4	0,244±0,013	9,3	0,167±0,003	11,6
Սպդ1	0,452±0,065	1,7	0,257±0,023	4,5	0,173±0,01	8,5
Սպդ2	0,446±0,091	3	0,254±0,017	5,6	0,169±0,006	10,6
Սպմ1	0,45±0,1	2,2	0,251±0,02	6,7	0,169±0,009	10,6
Սպմ2	0,439±0,041	4,6	0,244±0,012	9,3	0,163±0,004	13,8
ՊԱ1	0,409±0,107	11,1	0,242±0,016	10	0,163±0,003	13,8
ՊԱ2	0,393±0,0765	14,6	0,234±0,015	13	0,159±0,008	15,9

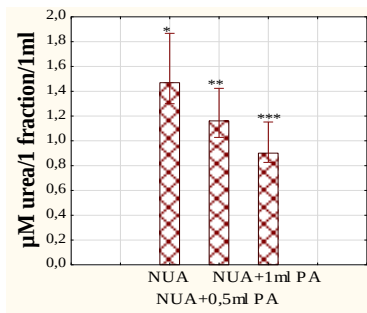
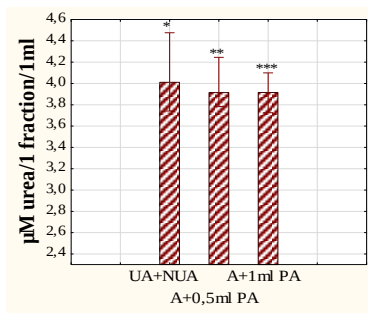
Աղյուսակ 3. Առանձին պոլիամինների ազդեցությունը երիկամների 1-ին, 2-րդ և գլխուղեղի ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվության վրա՝ հել-ֆիլտրացիայից հետո: Հյուսվածքի հումոգենատ 500մգ (5%-ոց) 9.5մլ գլիցինային բուֆերում՝ pH-9.5: Պուտ1 – 88 մկգ պուտրեսցին, Պուտ2 – 176 մկգ, Սպդ1 – 145 մկգ սպերմիդին, Սպդ2 – 290մկգ, Սպմ1 – 202մկգ սպերմին, Սպմ2 – 404 մկգ լուծված 1 մլ գլիցինային բուֆերում, ԵՈՌԻԱ1 – երիկամի 13-րդ ֆրակցիայի ոչ ուրեթեյիկ արգինազ, ԵՈՌԻԱ2 – երիկամի 22 – րդ ֆրակցիայի ոչ ուրեթեյիկ արգինազ, ԳՈՌԻԱ – գլխուղեղի ոչ ուրեթեյիկ արգինազ, n=10, p<0.001:

Արդյունքները վկայում են, որ պոլիամինների ազդեցությամբ արգելակվում է միայն ոչ ուրեթեյիկ արգինազը, իսկ ուրեթեյիկ արգինազի աննշան արգելակման պատճառ կարող է լինել ֆերմենտների մասնակի մաքրումը: Ինչպես երևում է պոլիամինների խառնուրդների և առանձին պոլիամինների արգելակող ազդեցությունները տարբեր են, որի պատճառները կպարզաբանվեն ստորև:

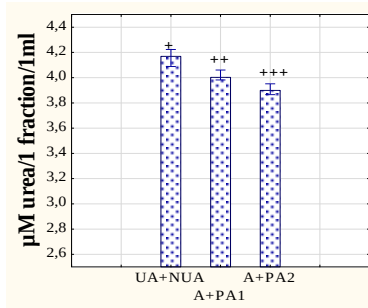
Լյարդի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվության արգելակման մեխանիզմի պարզաբանումը

Փորձարարական աշխատանքների հաջորդ փուլում իրականացվել է արգինազի իզոնեզիմների ակտիվության փոփոխության հետազոտություն էնդոգեն և էկզոգեն պոլիամինների խառնուրդների ազդեցությունից հետո: Բացի այդ, պարզաբանվել է նաև ոչ ուրեթեյիկ արգինազի արգելակման բնույթը և մեխանիզմները: Աշխատանքները սկսվել են լյարդի ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ուսումնասիրությամբ: Այս դեպքում ևս արգինազի իզոֆերմենտները նախօրոք ֆրակցիոնացվել են լյարդի հոմոգենատներից: Հել-ֆիլտրացիայից հետո ստացված արգինազի բարձրամոլեկուլային և ցածրամոլեկուլային ֆրակցիաների վրա ավելացվել է 0.5 և 1մլ էնդոգեն պոլիամինների և էկզոգեն պոլիամինների 1 և 2 մկմոլ (լուծված 1 մլ գլիցինային բուֆերում) խառնուրդ:

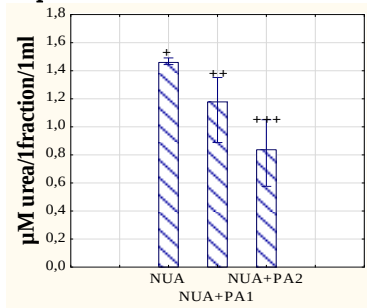
0.5մլ և 1մլ էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդը համապատասխանաբար պարունակում է 234 և 468 մկգ պոլիամին, իսկ 1 և 2 մլմոլ էկզոգեն պոլիամինների խառնուրդը 435 և 870 մկգ պոլիամին: Ինչպես երևում է ստացված արդյունքներից ուրեթեթիկ իզոնև պարունակող 13-րդ ֆրակցիայի 1մլ-ին էնդոգեն պոլիամինների 0,5 և 1 մլ խառնուրդների ավելացումից հետո արգինազային ընդհանուր ակտիվությունը արգելակվում է համապատասխանաբար 2,9 և 4,5%-ով (զծ. 2. ա): 25-րդ ֆրակցիայի 1մլ-ին էնդոգեն պոլիամինների 0,5 և 1 մլ խառնուրդների ավելացումից հետո ոչ ուրեթեթիկ արգինազի ակտիվությունը ընկնում է համապատասխանաբար 16,4 և 38 %-ով (զծ. 2. բ): Հել-ֆիլտրացիայից հետո ստացված արգինազի բարձրամոլեկուլային և ցածրամոլեկուլային ֆրակցիաների վրա ավելացվել է 1մլ 88 մկգ պուտրեցինի, 145մկգ սպերմիդինի և 202մկգ սպերմինի խառնուրդ (ՊԱ1) և 1մլ 176մկգ պուտրեցինի, 290մկգ սպերմիդինի և 404մկգ սպերմինի խառնուրդ (ՊԱ2): Փորձերը ցույց են տվել, որ լյարդի արգինազի բարձրամոլեկուլային իզոֆերմենտի արգելակումը ՊԱ1-ի և ՊԱ2-ի ազդեցությամբ համապատասխանաբար կազմում է 1,5 և 5% (զծ. 2. գ): Նշված երկու կոնցենտրացիայով պոլիամինների ավելացումը ցածրամոլեկուլային ֆրակցիայի ոչ ուրեթեթիկ իզոէնզիմի ինկուբացիոն միջավայր արգելակել է ոչ ուրեթեթիկ արգինազը 22,5% (ՊԱ1) և 44,3% (ՊԱ2) համապատասխանաբար (զծ. 2. դ): Բարձրամոլեկուլային ֆրակցիայի իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացված 1մլ 8-րդ ֆրակցիայի ոչ ուրեթեթիկ արգինազի ինկուբացիոն միջավայր 0,5 և 1մլ էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդի ավելացումը բերում է ֆերմենտի ակտիվության համապատասխանաբար 11,5 և 15% արգելակման (զծ. 2. ե), իսկ էկզոգեն պոլիամինների 1 և 2 մլմոլ խառնուրդի ավելացումը՝ համապատասխանաբար 14,5 և 17,8% արգելակման (զծ. 2. զ): Ստացված արդյունքները հաստատում են, որ ուրեթեթիկ արգինազը չի արգելակվում պոլիամինների ազդեցությամբ, իսկ աննշան արգելակումը արդյունք է այն բանի, որ նշված ֆրակցիան հոմոգեն չէ և պարունակում է ոչ ուրեթեթիկ իզոնև, իսկ ոչ ուրեթեթիկ արգինազի ակտիվության վրա պոլիամինների արգելակող ազդեցությունը ակներև է: Մինչ այժմ ներկայացված արդյունքները արդեն իսկ ցուցադրում են կարևորագույն կենսաբանական կապ ոչ ուրեթեթիկ արգինազի ակտիվության և պոլիամինների քանակության միջև: Հետագա փորձարարական հետազոտությունները ուղղված են եղել պոլիամինների ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրմանը և բացահայտմանը: Արգելակման մեխանիզմը պարզելու համար ուսումնասիրվել է ֆերմենտատիվ ռեակցիայի արագության կախումը արգինինի (10, 50, 100, 150, 250, 300 և 500 մլմոլ) տարբեր կոնցենտրացիաներից՝ պոլիամինների առկայությամբ և բացակայությամբ: Ինչպես երևում է Լայնդիվեր-Բերկի կորի կառուցվածքից պոլիամինները արգելակում են լյարդի ոչ ուրեթեթիկ արգինազի առաջին իզոէնզիմի (ֆրակցիա 25, հել-ֆիլտրացիայից հետո) ակտիվությունը խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով: Այս դեպքում արգինազի բնականոն և պոլիամինների ազդեցությամբ ստացված կորագծերը հատվում են ո՛չ արցիսների և ո՛չ օրդինատների վրա: Խառը տիպին պատկանող արգելակիչը միանում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնից դուրս գտնվող կարգավորող կենտրոնին, պոլիամինները փոխազդում են ինչպես ոչ ուրեթեթիկ արգինազի, այնպես էլ ոչ ուրեթեթիկ արգինազ-պոլիամին կոմպլեքսի հետ:



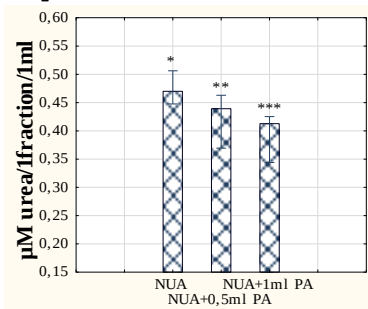
ա.



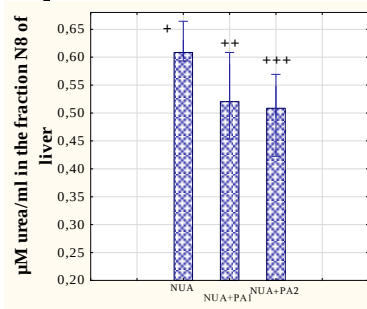
բ.



գ.



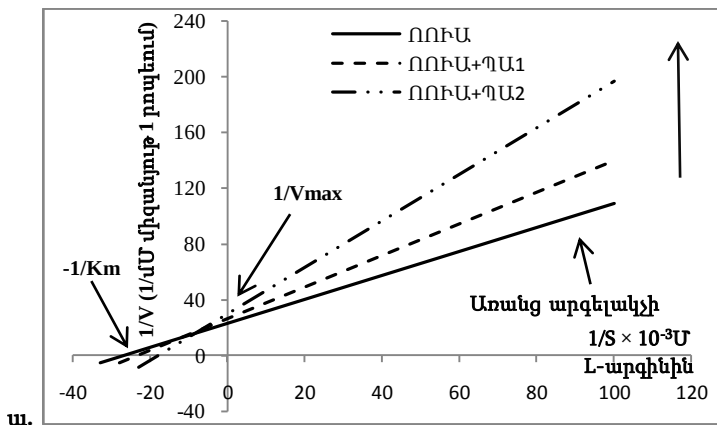
դ.



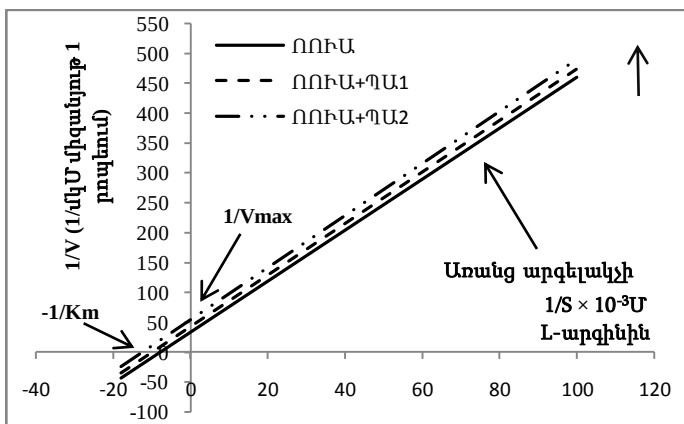
ե.

զ.

Գծապատկեր 2. Էնդոգեն (ա, բ, ե) և Էկզոգեն (գ, դ, զ) պոլիամինների ազդեցությունը լյարդի բարձրամոլեկուլային (ա և գ) (ՈՒՄ և ՈՈՒՄ, ֆրակցիա N13, n=8, p<0,001) և ցածրամոլեկուլային (բ և դ) (ՈՈՒՄ, ֆրակցիա N25, n=7, p<0,001) ֆրակցիաների իզոֆերմենտների ակտիվության վրա հել-ֆիլտրացիայից և իոնափոխանակային ջրոմատոգրաֆիայից հետո (ե, զ) (ՈՈՒՄ, ֆրակցիա N8, n=7, p<0,001): A – արգինազ, UA – ուրեթեյիկ արգինազ, NUA – ոչ ուրեթեյիկ արգինազ, PA – պոլիամիններ, PA1 – 88 մկգ պուտրեցինի, 145 մկգ սպերմիդինի և 202 մկգ սպերմինի խառնուրդ 1 մլ բուֆերում (pH 9,5), PA2 – 176 մկգ պուտրեցինի, 290 մկգ սպերմիդինի և 404 մկգ սպերմինի խառնուրդ, * և + – Էնդոգեն և Էկզոգեն պոլիամինների, ** և *** – 0,5 և 1մլ Էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդ, ++ և +++ – 1 և 2 մկմոլ Էկզոգեն պոլիամինների խառնուրդ



ա.



բ.

Գծապատկեր 3. Լայնուիվեր-Բերկի ռեակցիայի արագության և կոնցենտրացիայի հակադարձ մեծությունների կորը յարդի ՈՌԻԱ-ի համար՝ էկզոգեն պոլիամինների 1 և 2 մկմոլ խառնուրդների ազդեցության պայմաններում, հել - ֆիլտրացիայից հետո, ֆրակցիա N25 (n=5, p<0,05) և իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո՝ ֆրակցիա 8:

Խառը արգելակման ժամանակ պոլիամինների ազդեցությամբ յարդի ոչ ուրեոթելիկ արգինազի արգելակման հետևանքով նվազում է V_{max} -ը, աճում՝ K_m -ը ($K_{m_{\text{արգ}+\text{ՊԱ2}}} = 52.7 \times 10^{-6}$ մոլ, $K_{m_{\text{արգ}+\text{ՊԱ1}}} = 40.8 \times 10^{-6}$ մոլ, $K_{m_{\text{արգ}}} = 30.3 \times 10^{-6}$ մոլ), որը հաստատում է այն փաստը, որ պոլիամինները միանում են ոչ թե ակտիվ կենտրոնին, որպես մրցակցային արգելակիչներ, այլ ֆերմենտի կառուցվածքում առկա այլ ստերեոսպեցիֆիկ հատվածի (գծ. 3. ա, աղյուսակ 4): Մեր հետազոտություններում որոշվել է նաև առանձին պոլիամինների՝ պուտրեցին, սպերմիդին, սպերմին պոլիամինների ազդեցության բնույթը և մեխանիզմները: Լայնուիվեր-Բերկի ռեակցիայի արագության և սուբստրատի կոնցենտրացիայի հակադարձ մեծությունների կորագծի վերլուծությունը ցույց տվեց, որ բոլոր պոլիամինները յարդի ոչ ուրեոթելիկ արգինազի 1-ին իզոֆերմենտի համար համարվում են դասական ոչ մրցակցային արգելակիչներ: Լյարդի հոմոգենատի սեֆադեքս G-100-ով հել-քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացված

բարձրամոլեկուլային 13-րդ ֆրակցիան ենթարկվել է իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի CM-ցելյուլոզի միջոցով: Ի տարբերություն հել-քրոմատոգրաֆիայի, սպիտակուցի 8-րդ ֆրակցիան պարունակում է արգինազի ոչ ուրեոթելիկ ձևը, իսկ 21-րդ ֆրակցիան՝ ուրեոթելիկ իզոֆերմենտը:

Աղյուսակ 4. Ֆերմենտատիվ ռեակցիայի հիմնական հաստատունների արժեքները լյարդի ոչ ուրեոթելիկ արգինազների համար հել-ֆիլտրացիայից և իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից հետո

Ոչ ուրեոթելիկ արգինազ (ՈՌԻ-Ս)	K _m մկՄ	V _{max} նՄ միզանյութ/րոպե/մլ	V _{max} /K _m
Հել-ֆիլտրացիա, ֆրակցիա N25, Լյարդի ՈՌԻ-Ս1	30,3	49	1.42
Լյարդի ՈՌԻ-Ս1+ՊՍ1	40,8	40	0.98
Լյարդի ՈՌԻ-Ս1+ՊՍ2	52.7	33.3	0.63
CM-ցելյուլոզ, 8-րդ ֆրակցա, լյարդի ՈՌԻ-Ս2	125	33.3	0,26
Լյարդի ՈՌԻ-Ս2+ՊՍ1	95	25	
Լյարդի ՈՌԻ-Ս2+ՊՍ2	75,8	19.3	

Լայնուլիվեր-Բերկի կորագծերը լյարդի հել-քրոմատոգրաֆիայից հետո ստացված բարձրամոլեկուլային ֆրակցիայի իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայից ստացված ոչ ուրեոթելիկ արգինազի (իզոֆերմենտ N2) համար միմյանց զուգահեռ են (գծ. 3. ք): Նկատվում է ինչպես Km-ի ($K_{m_{\text{պգ+ՊՍ2}}} = 75.8 \times 10^{-6}$ մոլ, $K_{m_{\text{պգ+ՊՍ1}}} = 95 \times 10^{-6}$ մոլ, $K_{m_{\text{պգ}}} = 125 \times 10^{-6}$ մոլ), այնպես էլ V_{max}-ի արժեքների նվազում (աղյուսակ 4): Այս արգելակման ժամանակ ի տարբերություն մրցակցային արգելակման, արգելակիչը միանում է ակտիվ կենտրոնից դուրս գտնվող մեկ այլ ստերեոսպեցիֆիկ կենտրոնի: Ընդ որում պոլիամինները ի տարբերություն խառը տիպի արգելակման, միանում է միայն ֆերմենտ-սուբստրատ կոմպլեքսին: Առանձին պոլիամինների ազդեցության դեպքում դիտվում է նմանատիպ պատկեր:

Այս արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնելու ոչ ուրեոթելիկ արգինազի կարգավորվող ֆերմենտ լինելու հանգամանքը: Պոլիամինների կողմից լյարդի երկու ոչ ուրեոթելիկ արգինազների արգելակման մեխանիզմների տարբերությունը թույլ է տալիս ենթադրելու, որ ոչ ուրեոթելիկ արգինազի այդ երկու ֆրակցիաները պարունակում են միմյանցից տարբերվող երկու իզոէնզիմներ: Պոլիամինների խառնուրդների և առանձին պոլիամինների արգելակող ազդեցությունները և մեխանիզմները տարբեր են, հետևաբար ոչ ուրեոթելիկ արգինազի կարգավորիչ կենտրոնին միանալու համար պոլիամինների միջև առկա է մրցակցություն. այդ հատվածին առաջինը միանում են այն պոլիամինները, որոնք ունեն առավել մեծ pK_a-ի արժեք:

Երիկամի և գլխուղեղի ոչ ուրեոթելիկ արգինազների արգելակման մեխանիզմների պարզաբանումը

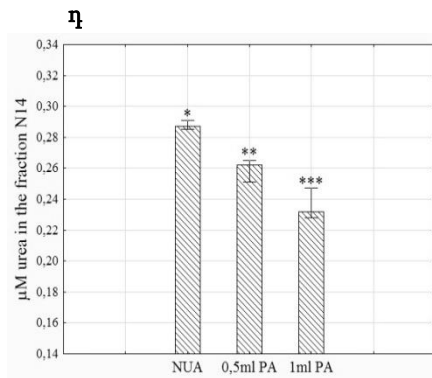
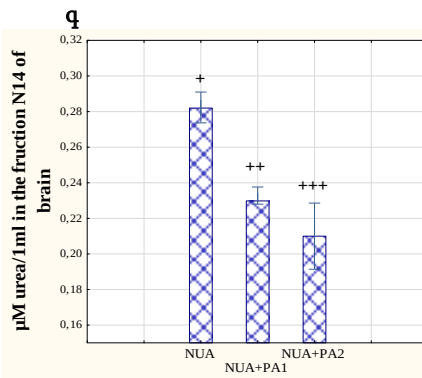
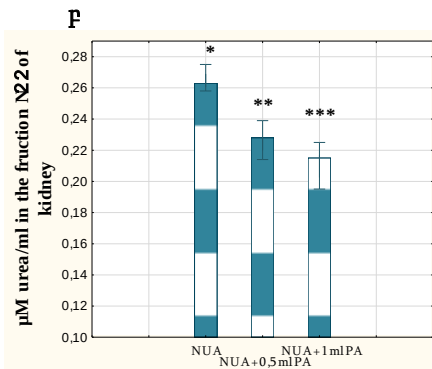
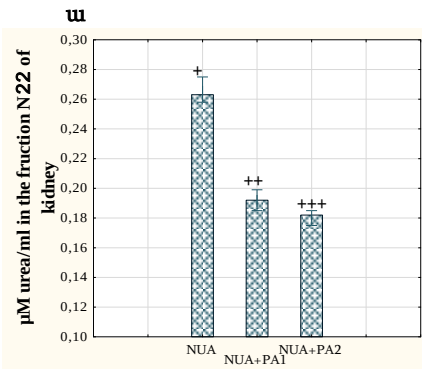
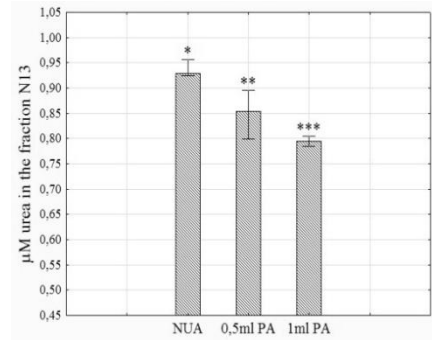
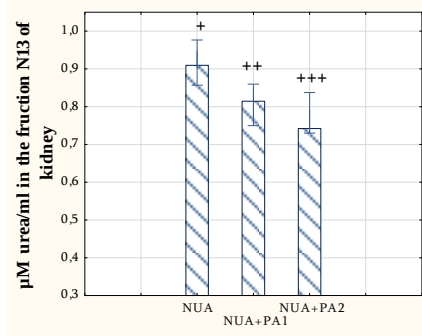
Ինչպես նշվեց վերևում երիկամների հոմոգենատի հել-ֆիլտրացիայից հետո ստացվել է սպիտակուցի և արգինազի ակտիվության 2-ական զազաթ: Սպիտակուցի բարձրամոլեկուլային և ցածրամոլեկուլային ֆրակցիաները պարունակում են միայն ոչ ուրեոթելիկ արգինազ: Հետազոտական աշխատանքների համար օգտագործվել են 13 և

22 ֆրակցիաները: Երիկամի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի 2-րդ իզոֆերմենտի ինկուբացիոն միջավայր 1մլ ՊԱ1-ի ավելացումից հետո ֆերմենտի ակտիվությունը արգելակվում է 9%-ով, իսկ 1մլ ՊԱ2-ի ավելացումից հետո՝ 11%-ով (զծ. 4. ա): Լայնուփվեր-Բերկի կորագծերը երիկամի 13-րդ ֆրակցիայի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի դեպքում միմյանց զուգահեռ են, որը ցուցադրում է արգելակման անմրցակցային բնույթը (զծ. 5.1): Նկատվում է ինչպես Km-ի ($Km_{\text{Արգ+ՊԱ2}} = 15,36 \times 10^{-6}$ մոլ, $Km_{\text{Արգ+ՊԱ1}} = 16,1 \times 10^{-6}$ մոլ, $Km_{\text{Արգ}} = 18,25 \times 10^{-6}$ մոլ), այնպես էլ Vmax-ի արժեքների նվազում (աղյուսակ 5): Այս դեպքում պոլիամինները միանում են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնից դուրս գտնվող ալլոստերիկ կենտրոնին, սակայն տարբերությունը խառը տիպի արգելակումից այն է, որ արգելակիչը միանում է միայն ֆերմենտ-սուբստրատ կոմպլեքսին: 22-րդ ֆրակցիայի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ինկուբացիոն միջավայր էկզոգեն պոլիամինների 1 (ՊԱ1) և 2 մկմոլ (ՊԱ2) խառնուրդի ավելացման դեպքում դիտվում է համապատասխանաբար 27 և 33% արգելակում (զծ. 4. գ): Երիկամի արգինազի ցածրամոլեկուլային իզոֆերմենտի արգելակման մեխանիզմը պարզելու համար նույնպես օգտագործվել է պոլիամինների խառնուրդի 2 կոնցենտրացիա: Այս դեպքում պոլիամինները ինչպես լարդի առաջին ոչ ուրեթեյիկ արգինազի դեպքում արգելակում են խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով (զծ. 5.2): Արգելակման ժամանակ նվազում է Vmax-ը, իսկ Km-ը աճում է (աղյուսակ 5):

Գլխուղեղի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվությունը արգելակվում է 18%-ով, երբ ազդում ենք 1մլ ՊԱ1-ով և 25,5%-ով, երբ ավելացնում ենք ֆերմենտի ինկուբացիոն միջավայր 1մլ ՊԱ2 (զծ. 4. ե): Լայնուփվեր-Բերկի կորագծերը գլխուղեղի արգինազի դեպքում չեն հատվում ո՛չ օրդինատների և ո՛չ էլ աբսցիսների առանցքի վրա (զծ. 5.3): Սա տեղի է ունենում խառը տիպի արգելակման ժամանակ: Նշանակում է, որ պոլիամինները միանում են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնից դուրս գտնվող ստերեոսպեցիֆիկ՝ ալլոստերիկ կենտրոնի հետ: Այն միանում է ինպես ֆերմենտին այնպես էլ ֆերմենտ-սուբստրատ կոմպլեքսին: Պոլիամինների ազդեցությամբ նվազում է Vmax-ի արժեքները:

Աղյուսակ 5. Ֆերմենտատիվ ռեակցիայի հիմնական հաստատունների արժեքները երիկամների և գլխուղեղի ոչ ուրեթեյիկ արգինազների համար հել-ֆիլտրացիայից հետո

Ոչ ուրեթեյիկ արգինազ (ՈՌԻԱ)	K _m մկՄ	V _{max} նՄ միզակյուր/րոպե/մլ	V _{max} /K _m
Հել-ֆիլտրացիա, ֆրակցիա N13			
Երիկամի ՈՌԻԱ1	18,25	25,65	1,5
Երիկամի ՈՌԻԱ1+ՊԱ1	16,1	23,8	
Երիկամի ՈՌԻԱ1+ՊԱ2	15,36	22,9	
Հել-ֆիլտրացիա, ֆրակցիա N22			
Երիկամի ՈՌԻԱ2	12,8	12,5	0,93
Երիկամի ՈՌԻԱ2+ՊԱ1	19,2	10,5	0,55
Երիկամի ՈՌԻԱ2+ՊԱ2	20	10,1	0,51
Հել-ֆիլտրացիա, ֆրակցիա N14			
Գլխուղեղի ՈՌԻԱ	10,85	7,2	0,67
Գլխուղեղի ՈՌԻԱ+ՊԱ1	11,8	6,55	0,56
Գլխուղեղի ՈՌԻԱ+ՊԱ2	13	6,25	0,48

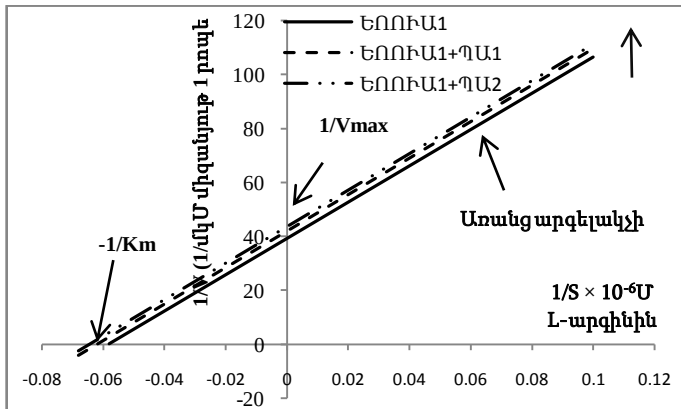


ե

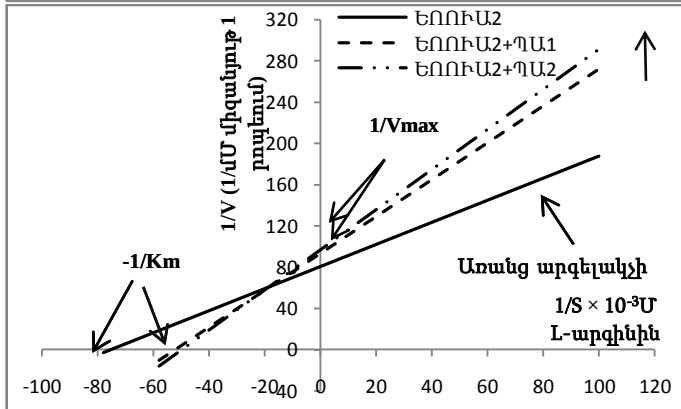
զ

Գծապատկեր 4. Էկզոգեն (ա, գ, ղ) և էնդոգեն (բ, դ, զ) պոլիամինների ազդեցությունը երկվամների ոչ ուրեթեյիկ արգինազի առաջին (ա, բ), երկրորդ (գ, դ) և զլխադեղի (ե, զ) իզոֆերմենտների ակտիվության վրա (ֆրակցիա N13, n=8, p<0,01). NUA – ոչ ուրեթեյիկ արգինազ, PA – պոլիամիններ, ++ և ** – 1մլ 1 մկմոլ էկզոգեն պուտրեսցինի, սպերմիդինի, սպերմինի խառնուրդի և 0,5մլ էնդոգեն պոլիամինների ազդեցությունը, +++ և *** – 1մլ 2 մկմոլ պուտրեսցինի, սպերմիդինի, սպերմինի խառնուրդի և 1մլ էնդոգեն պոլիամինների խառնուրդների ազդեցությունը

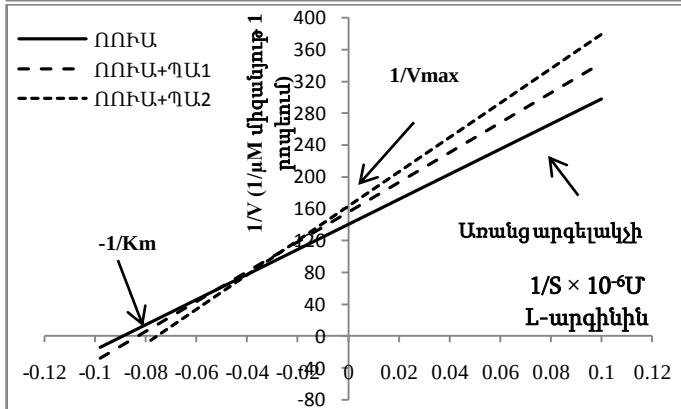
1.



2.



3.

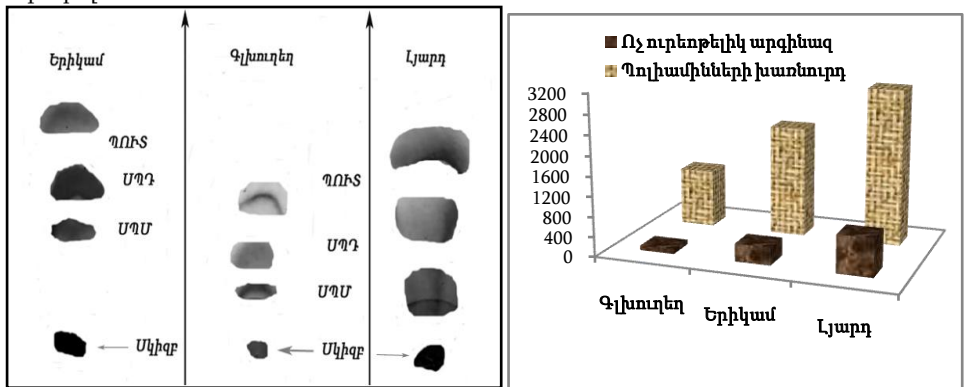


Գծապատկեր 5. Լայնուփվեր-Բերկի ռեակցիայի արագության, կոնցենտրացիայի հակադարձ մեծությունների կորը երիկամի ոչ ուրեթեթիկ արգինազի առաջին (1), երկրորդ (2), գլխուղեղի (3) իզոֆերմենտների համար՝ էկզոգեն պոլիամֆինների 1 և 2 մկմոլ խառնուրդների ազդեցության պայմաններում՝ հել - ֆիլտրացիայից հետո, $n=5$, $p \leq 0,05$:

Այսպիսով, ոչ ուրեթեյիկ արգինազային ռեակցիայի արգության և L-արգինինի կոնցենտրացիայի կախվածության հակադարձ մեծությունների Լայնուիվեր-Բերկի կորագծերի վերլուծությունը պոլիամինների առկայությամբ և բացակայությամբ, վկայում է, որ պոլիամինները արգելակում են ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվությունը ոչ մրցակցային արգելակաման մեխանիզմով: Ոչ ուրեթեյիկ արգինազի լյարդի առաջին, երկրամների երկրորդ և գլխուղեղի իզոֆերմենտները արգելակվում են խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով, իսկ ոչ ուրեթեյիկ արգինազի լյարդի երկրորդ և երկրամների առաջին իզոֆերմենտները՝ անմրցակցային տիպի արգելակման մեխանիզմով:

Պոլիամինների քանակության և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվության համեմատումը առնետի տարբեր հյուսվածքներում

Առնետի երկրամների, լյարդի և գլխուղեղի հոմոգենատներում որոշվել է պուրեյսի, սպերմիդինի և սպերմինի քանակությունը նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի միջոցով և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվությունը Արչիբալդի մեթոդով:



Գծապատկեր 6. Պոլիամինների քանակական անալիզ ՆՇՔ-ի միջոցով (ձախից, $n=8$, $p<0,05$) և պոլիամինների քանակության ու ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվության համեմատումը առնետի տարբեր հյուսվածքներում (աջից, $n=8$, $p<0,05$): Հոմոգենատը՝ 10%-ոց (300մգ հյուսվածք լուծված 3մլ 5%-ոց HClO_4 -ում, թիթեղի չափերը՝ 15սմ×15սմ, շարժուն ֆազի անցողությունը՝ 10սմ, օրիջինի (սկիզբ) դիրքը՝ 1,5-2սմ թիթեղի ծայրից): RF արժեքները երիկամների, գլխուղեղի և լյարդի համար՝ համապատասխանաբար $\text{RF}_{\text{սպմ}}=0.47_{\text{երիկ}}; 0.26_{\text{գլխ}}; 0.28_{\text{լյարդ}}; \text{RF}_{\text{սպլ}}=0.59_{\text{երիկ}}; 0.38_{\text{գլխ}}; 0.49_{\text{լյարդ}}; \text{RF}_{\text{պուտ}}=0.79_{\text{երիկ}}; 0.53_{\text{գլխ}}; 0.67_{\text{լյարդ}}$: Արգինազի ակտիվություն՝ մկմոլ միզանյութ/1գ. հյուսվածք, պոլիամինի քանակություն՝ մկգ/1գ. հյուսվածք:

Հայտնի է, որ գլխուղեղում և երիկամներում հանդիպում է միայն ոչ ուրեթեյիկ արգինազը, իսկ լյարդում և ուրեթեյիկ, և ոչ ուրեթեյիկ իզոմերները: Լյարդի ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվության չափը որոշվել է հոմոգենատների սեֆաղեքս G-100-ով և ԿՄ-ցելյուլոզով անցկացնելուց հետո ցածրամոլեկուլային և բարձրամոլեկուլային ֆրակցիաներում արգինազի իզոմերների ակտիվությամբ: Հոմոգենատում ոչ ուրեթեյիկ արգինազի ակտիվությունը կազմում է արգինազի ընդհանուր ակտիվության 7-9%: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ ոչ

ուրեթեյիկ արգինազի ընդհանուր ակտիվությունը աճում է գլխուղեղ>երիկամներ>լյարդ շարքում, որը համապատասխանում է տվյալ օրգաններում պոլիամինների քանակության աճին՝ գլխուղեղ>երիկամներ>լյարդ:

Աղյուսակ 6. Պոլիամինների քանակությունը առնետի տարբեր օրգաններում, n=7, p<0.05, *-մկգ պոլիամին 1գ հյուսվածքում

Օրգաններ	ՊՈԻՏ	ՄՊԴ	ՄՊՍ	Ընդհանուր
Լյարդ	180±54*	1260±172	1680±153	3120±379
Երիկամ	350±92	730±103	1130±164	2210±359
Գլխուղեղ	160±33	429±86	571±94	1160±213

Պոլիամինների ներերակային ներարկումից 12 և 24 ժամ հետո արգինազի իզոնեգիմների ակտիվությունների փոփոխությունը լյարդում, երիկամներում և գլխուղեղում

ՌԻ-սումմասիրության այս փուլում կատարվել է էկզոգեն պոլիամինների խառնուրդի ներերակային ներարկում առնետների պոչի լատերալ երակից: Ներարկման համար ընտրվել է պոլիամինների երկու կոնցենտրացիա՝ 0,5մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթում յուրաքանչյուր պոլիամինից 25 և 50 մկմոլ [Deusdella T. et al., 2002, Palanimurugan R. et al., 2004; Dusan S. et al., 2010]: Առնետների միջին զանգվածը կազմել է 200գ: Առնետները բաժանվել են 4 խմբի:

Աղյուսակ 7. Պոլիամինների ներերակային ներարկումից հետո արգինազի գումարային ակտիվությունը հոմոգենատներում, * - մկՍ միզանյութ արտահայտված 1գ. հետազոտվող հյուսվածքում, n=5, p<0,05; ** - արգելակում, α - ստուգիչ խումբ, β - կատարվել է միայն 0,5մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթի ներարկում, γ - 50մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում, δ - 100մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում

Արգինազի ակտիվության որոշում	Օրգաններ	Ստուգիչ խումբ ^α	0.5մլ ֆիզ. լուծույթ pH-7.4 ^β	0.5մլ 50մգ/կգ ՊԱ խառնուրդ ^γ 50 մկՍ	0.5մլ 100մգ/կգ ՊԱ խառնուրդ ^δ 100մկՍ
12 ժամ	Լյարդ	6348,4 [±] 124,6	6294,7±146,7 0,82%**	6110,3±101,1 3.75%	6003,7±116,4 5.4%
	Գլխուղեղ	98,1±12,8	96,9±9,5 1.3%	77,4±15,7 21.1%	64,3±12,4 34.5%
	Երիկամ	312,2±18	304,9±12,4 2,34%	286,8±11,2 8,2%	278,4±13,6 10,8%
24 ժամ	Լյարդ	6102,3 [±] 170	6052,7±140,3 0.8%	6000,3±118,1 1.7%	5967,7±136,1 2.3%
	Գլխուղեղ	86,2±9,8	82,9±7,4 3.8%	73,8±13,7 14.4%	65,9±13,1 23.5%
	Երիկամ	278,9±8	274,9±10,9 1.4%	265,3±12,5 4.9%	258,6±10,3 7.3%

Առաջինը՝ ստուգիչ խումբն է: Այս խմբի առնետներին ներարկում չի կատարվել, որոշվել է լյարդի, երիկամների և գլխուղեղի արգինազների ակտիվությունը ստանդարտ վիճակում: Քանի որ պոլիամինների ներարկումը կատարվել է ֆիզիոլոգիական լուծույթում լուծված վիճակում, այդ իսկ պատճառով, մինչ փորձարարական խմբերին ներարկելը, երկրորդ խմբին կատարվել է միայն ֆիզիոլոգիական լուծույթի ներարկում: Երրորդ խմբին կատարվել է 50մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում: Խառնուրդի պատրաստման համար օգտագործվել են պուտրեսցին՝ 2.2 մգ, սպերմիդին՝ 4 մգ և սպերմին 5 մգ (յուրաքանչյուրը 25 մկՄ քանակով): Չորրորդ խմբին կատարվել է 100մգ/կգ հարաբերակցությամբ պոլիամինների խառնուրդի ներարկում: Այս դեպքում խառնուրդի պատրաստման համար օգտագործվել են պուտրեսցին՝ 4.4 մգ, սպերմիդին՝ 8 մգ և սպերմին 10 մգ պոլիամինները (յուրաքանչյուրը 50 մկՄ քանակով): Պոլիամինների ներերակային ներարկումից 12 և 24 ժամ հետո առնետի լյարդի, երիկամների, գլխուղեղի հոմոգենատներում որոշվել է արգինազի ընդհանուր ակտիվությունը: Ինչպես երևում է աղյուսակ 7-ից և 8-ից արգինազի ավելի խորը արգելակում տեղի է ունեցել ներարկումից 12ժամ հետո, իսկ ակտիվության որոշումը 24 ժամ հետո ցույց տվեց ակտիվության մոտեցում ելակետային արժեքին, բացառությամբ գլխուղեղի արգինազի ակտիվության, որտեղ դեռ արգելակումը մնում էր բավականին խորը:

Աղյուսակ 8. Լյարդի հոմոգենատի հել-քրոմատոգրաֆիայից ստացված սպիտակուցի բարձրամոլեկուլային և ցածրամոլեկուլային ֆրակցիաների արգինազի իզոձևերի ակտիվության փոփոխությունը պոլիամինների 25 և 50 մկմոլ խառնուրդների ներարկումից 12 և 24 հետո, n=5, p<0,05:

Արգինազի ակտիվության որոշում	* - ՈՈՒԱ և ՈՒԱ ** - ՈՈՒԱ	մկմոլ միզանյութ 1 ֆրակցիայի/1 մլ, 0,5%-ոց հոմոգենատ; 0,5մլ վերեստվածք	Արգելակում %
12 ժամ հետո	Լյարդի ԲՄՖ*	1,825±0.085	-
	ԲՄՖ+ֆիզ. լուծույթ	1,784±0.098	2.2
	ԲՄՖ+50մգ/կգ ՊԱ	1,768±0.072	3.1
	ԲՄՖ+100մգ/կգ ՊԱ	1,739±0.069	4.7
	Լյարդի ՑՄՖ**	0,487±0.057	-
	ՑՄՖ+ֆիզ. լուծույթ	0,472±0.069	3.1
	ՑՄՖ+50մգ/կգ ՊԱ	0,425±0.049	12.7
	ՑՄՖ+100մգ/կգ ՊԱ	0,401±0.075	17.6
24 ժամ հետո	Լյարդի ԲՄՖ	1,718±0,072	-
	ԲՄՖ+Ֆիզ. լուծույթ	1,695±0,071	1,3
	ԲՄՖ+50մգ/կգ ՊԱ	1,684±0,036	1.9
	ԲՄՖ+100մգ/կգ ՊԱ	1,672±0,019	2.6
	Լյարդի ՑՄՖ	0,432±0,072	-
	ՑՄՖ+Ֆիզ. լուծույթ	0,427±0,08	0,8
	ՑՄՖ+50մգ/կգ ՊԱ	0,409±0,036	5.3
	ՑՄՖ+100մգ/կգ ՊԱ	0,398±0,042	7.9

Այստեղ ևս նկատվում էր լյարդի արգինազի համեմատաբար թույլ արգելակում ակտիվության որոշման 12-րդ և 24-րդ ժամում, որը հիմք հանդիսացավ ենթադրելու, որ արգելակման ֆոնը պայմանավորված է հոմոգենատում առկա ոչ ուրեթեյիկ արգինազով: Հել-ֆիլտրացիայի միջոցով հոմոգենատների ֆրակցիոնացումից հետո, ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների ակտիվությունների որոշումը ցույց տվեց, որ տեղի է ունեցել ուրեթեյիկ արգինազի թույլ արգելակում, իսկ ոչ ուրեթեյիկ արգինազի արգելակումը 12-րդ ժամում կազմել է 12,7-17,6%, իսկ 24-րդ ժամում 5,3-7,9%:

25 և 50 մկմոլ պոլիամինների 0,5մլ խառնուրդի ներերակային ներակումը առնետի պոչի լատերալ երակից ցույց տվեց, որ պոլիամինների ազդեցությամբ արգելակվում է ոչ ուրեթեյիկ արգինազը, իսկ ուրեթեյիկ իզոձևի արգելակման աննշան չափը պայմանավորված է պոլիամինների ազդեցությամբ օրնիթինի քանակի ավելացմամբ: Նշված արդյունքները համապատասխանում են *in vitro* փորձերում ստացված արդյունքներին:

Ամփոփում

Պոլիամինները՝ պուտրեցինը, սպերմինը, պոլիկատինային, հիդրոֆիլ և փոքր մոլեկուլային զանգված ունեցող միացություններ են, որոնք ունեն շատ լայն կենսաբանական տարածվածություն (ներկայցված են գրեթե բոլոր օրգանիզմներում) [Pegg A. E. 1982; Pekka Kilpelainen 2002]: Ցույց է տրված, որ պուտրեցինը օրնիթինի դեկարբօքսիլացման պրոդուկտն է, իսկ սպերմինը և սպերմինը առաջանում են պուտրեցինից S-ադենոզիլմեթիոնինի մասնակցությամբ [Morris Jr., S. M. 2009; Kristina K. 2010]: Երկար ժամանակ պոլիամինների դերի վերաբերյալ չկային լուրջ հետազոտություններ, բայց ներկայումս հետաքրքրությունը պոլիամինների նկատմամբ խիստ բարձրացել է, կապված այն հանգամանքի հետ, որ բազմաթիվ հեղինակների կողմից ցույց տրվեց պոլիամինների դերը ԴՆԹ-ի կառուցվածքի կայունացման գործում [Celano P. et al., 1989; Jian-Ying Wang and Robert A. Casero Jr. 2006]: Շուտով հանդես եկան բազմաթիվ արժեքավոր հետազոտություններ պոլիամինների բազմաթիվ այլ կենսաբանական պրոցեսներում ունեցած դերի մասին, մասնավորապես այն, որ նրանք մասնակցում են տրանսկրիպցիոն և տրանսլյացիոն պրոցեսներին, ապոպտոզին, Ի-ՌՆԹ-ի կառուցվածքի կայունացմանը, քրոմատինի կառուցվածքի մոդուլյացիային, ռեցեպտոր-լիգանդ փոխազդեցությանը, ազդանշանի փոխանցմանը, իոնային անցուղիների աշխատանքին, բջջի շարժունությանը, մեմբրանի կայունությանը, բջջի աճին, դիֆերենցացիային և պոլիմիթրացիային, նեյրոնների ռեգեներացիային և զարգացմանը [Kuiiper M. A. 2000; Lange P. S. et al., 2004; Bachrach U. 2001; Bachetti T. 2004; Cai D. Et al., 2002; Camon L. 2001; Dagostino et al., 2002; Deignan J. L. et al., 2008; Devens B. H. Et al., 2000; Filbin M. T. 2003; Gerner E. W. 2004; Liu L. 2003, 2005]: Միաժամանակ պետք է նշենք, որ դեռևս պարզաբանման կարիք ունեն պոլիամինների կենսասինթեզի որոշ էական հարցեր: Պարզաբանված չէր պոլիամինների կենսասինթեզի առաջին ֆերմենտի՝ արգինազի բնույթի (ուրեթեյիկ, թե ոչ ուրեթեյիկ) հարցը: Դեռևս 1967թ. առաջ է քաշվել այն վարկածը, որ պոլիամինների կենսասինթեզում մասնակցող առաջին ֆերմենտը ոչ ուրեթեյիկ արգինազն է [Давтян М. А. 1966, 1967, 1970]:

Տվյալ առենախոսությունում ուսումնասիրվել է ուրեթեյիկ և ոչ ուրեթեյիկ արգինազների իզոէնզիմների մասնակցությունը պոլիամինների կենսասինթեզում: Այդ

նպատակով մանրամասն հետազոտվել է արգինազների պոլիամիններով արգելակվելու կինետիկան: Մեր կողմից ցույց տրվեց ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի արգելակումը պոլիամինների ազդեցության ներքո, մինչդեռ այդ տեսակետից ուրեոթեյիկ արգինազը լրիվ անտարբեր է: Ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի արգելակումը պոլիամինների ազդեցության ներքո ունի ոչ մրցակցային բնույթ: Այլ կերպ ասած պոլիամինները արգելակում են ֆերմենտին՝ միանալով ակտիվ կենտրոնից դուրս գտնվող հատուկ կարգավորիչ կենտրոնին: Մինչդեռ ուրեոթեյիկ արգինազը, որը ներկայացված է միայն ուրեոթեյիկ օրգանիզմների յարդում՝ նման կարգավորիչ կենտրոն չունի:

Նախորդ մեր հետազոտություններում մանրամասն ուսումնասիրվեցին առնետի տարբեր օրգաններում գոյություն ունեցող արգինազի իզոէնզիմները: Հել-ֆիլտրացիայի և իոնափոխանակային թրոմատոգրաֆիայի միջոցով ցույց է տրվել, որ յարդում առկա է մեկ ուրեոթեյիկ և երկու ոչ ուրեոթեյիկ արգինազների իզոֆերմենտներ, երիկամներում երկու ոչ ուրեոթեյիկ իզոէնզիմների, իսկ գլխուղեղում՝ մեկ ոչ ուրեոթեյիկ արգինազ [Давтян М. А. 2005]: Այս ատենախոսությունում նշված իզոֆերմենտների արգելակման մեխանիզմները պոլիամինների ազդեցության ներքո պարզաբանվել են ֆերմենտատիվ ռեակցիայի արագության և սուբստրատի կոնցենտրացիայի հակադարձ մեծությունների կախվածության Լայնուիվեր-Բերկի կորագծի միջոցով: Ոչ ուրեոթեյիկ արգինազային ռեակցիայի արագության և L-արգինինի կոնցենտրացիայի կախվածության Միխայելիս-Մենտենի և հակադարձ մեծությունների Լայնուիվեր-Բերկի կորագծերի և հավասարումների վերլուծության արդյունքներից պոլիամինների առկայությամբ և բացակայությամբ, պարզաբանվեց, որ պոլիամինները արգելակում են ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի ակտիվությունը ոչ մրցակցային արգելակման մեխանիզմի տարբեր տիպերով: Հաստատվել է, որ ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի յարդի առաջին, երիկամների երկրորդ և գլխուղեղի իզոֆերմենտները (ստացվել են Սեֆադեքս-G100- հել-ֆիլտրացիայի ենթարկելուց հետո) էկզոգեն և էնդոգեն պոլիամինների կողմից արգելակվում են խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով, իսկ ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի յարդի երկրորդ (ստացվել է յարդի բարձրամոլեկուլային ֆրակցիայի CM-ցելյուլոզով իոնափոխանակային թրոմատոգրաֆիայից հետո) և երիկամների առաջին (ստացվել է հել-ֆիլտրացիայից հետո) իզոֆերմենտները՝ անմրցակցային տիպի արգելակման մեխանիզմով: Գրականության տվյալների վերլուծությունը թույլ է տալիս նշելու, որ խառը տիպի արգելակման ժամանակ պոլիամինները միանում են ինչպես ոչ ուրեոթեյիկ արգինազին, այնպես էլ ոչ ուրեոթեյիկ արգինազ-արգինին կոմպլեքսին, իսկ անմրցակցային տիպի արգելակման ժամանակ պոլիամիններ միանում են ֆերմենտ-սուբստրատ կոմպլեքսին: Ստացված արդյունքների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով արգելակվող ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի իզոէնզիմները և անմրցակցային տիպի մեխանիզմով արգելակվող ոչ ուրեոթեյիկ արգինազի իզոէնզիմները տարբերվում են միմյանցից Km-ի և Ki-ի արժեքներով:

Կարող ենք ամփոփել և ընդգծել, որ հետազոտվող օրգաններում պարունակվում է արգինազի տարբեր իզոէնզիմներ, որոնք անկասկած ունեն տարբեր մետաբոլիկ դերեր: Հաստատված է, որ յարդում գտնվող ուրեոթեյիկ արգինազը չի մասնակցում պոլիամինների կենսասինթեզում, քանի որ չի արգելակվում պոլիամինների ազդեցությամբ: Ինչ վերաբերվում է ոչ ուրեոթեյիկ արգինազների իզոէնզիմներին, ապա նրանք մասնակցում են պոլիամինների կենսասինթեզին, քանի որ արգելակվում են պոլիամինների ազդեցությամբ: Բնականաբար, հարց է առաջանում ոչ ուրեոթեյիկ

արգինազի իզոէնզիմների, պոլիամիններով արգելակվելու կինետիկայի տարբերության վերաբերյալ: Այդ կապակցությամբ կարող ենք նշել, որ այդ իզոէնզիմներից մեկը կամ մի քանիսը կարող են մասնակցել նաև պրոլինի, NO-ի, գուանիդինային միացությունների (կրեատին), հիստոնների կենսասինթեզում: Տրամաբանական է, որ նշված պրոցեսներում մասնակցող տարբեր իզոէնզիմները ունեն պոլիամինների միացման տարբեր կենտրոններ և արգելակման տարբեր մեխանիզմներ: Այս հարցերի պարզաբանումը պահանջում է նոր հետազոտություններ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Պոլիամինները արգելակում են ոչ ուրեոթեիկ արգինազին և չեն ազդում ուրեոթեիկ արգինազի ակտիվության վրա:
2. Ոչ ուրեոթեիկ արգինազային ռեակցիայի արգության և L-արգինինի կոնցենտրացիայի կախվածության Միխայելիս-Մենտենի և հակադարձ մեծությունների Լայնուիվեր-Բերկի կորագծերի և հավասարումների վերլուծությունը պոլիամինների առկայությամբ և բացակայությամբ, վկայում է, որ պոլիամինները արգելակում են ոչ ուրեոթեիկ արգինազի ակտիվությունը ոչ մրցակցային արգելակման մեխանիզմով:
3. Ոչ ուրեոթեիկ արգինազի լյարդի առաջին, երիկամների երկրորդ և գլխուղեղի իզոֆերմենտները արգելակվում են խառը տիպի արգելակման մեխանիզմով, իսկ ոչ ուրեոթեիկ արգինազի լյարդի երկրորդ և երիկամների առաջին իզոֆերմենտները՝ անմրցակցային տիպի արգելակման մեխանիզմով:
4. Պոլիամինների խառնուրդների և առանձին պոլիամինների արգելակող ազդեցությունները և մեխանիզմները տարբեր են: Ոչ ուրեոթեիկ արգինազի կարգավորիչ կենտրոնին միանալու համար պոլիամինների միջև առկա է մրցակցություն: Այդ հատվածին առաջինը միանում են այն պոլիամինները, որոնք ունեն առավել մեծ pK_a-ի արժեք:
5. Հետազոտվող օրգանների ոչ ուրեոթեիկ արգինազների արգելակման մեխանիզմները ու ոչ ուրեոթեիկ արգինազների Km-ները և Ki-ները վկայում են լյարդում ոչ ուրեոթեիկ արգինազի երկու, երիկամներում՝ երկու և գլխուղեղում՝ մեկ իզոֆերմենտներ:
6. Ոչ ուրեոթեիկ արգինազի ընդհանուր ակտիվությունը աճում է գլխուղեղ>երիկամներ>լյարդ շարքում, որը համապատասխանում է սովյալ օրգաններում պոլիամինների քանակության աճին՝ գլխուղեղ>երիկամներ>լյարդ:
7. 25 և 50 մկմոլ պոլիամինների 0,5մլ խառնուրդի ներերակային ներակման հետևանքով առնետի պոչի լատերալ երակից, պոլիամինների ազդեցությամբ արգելակվում է ոչ ուրեոթեիկ արգինազը, իսկ ուրեոթեիկ իզոձևի արգելակման աննշան չափը պայմանավորված է պոլիամինների ազդեցությամբ օրնիթինի քանակի ավելացմամբ: Նշված արդյունքները համապատասխանում են *in vitro* փորձերում ստացված արդյունքներին:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցուցակը

1. Автандилян Н. В., Джаврушян А.Г., Влияние эндогенных полиаминов на активность изоферментов аргиназы в печени крыс. 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов, ст 162-163.
2. Avtandilyan N. V., Karapetyan S. A., Davtyan M. A., The change of kinetics of arginase isoforms under influence of endogenous polyamines in rat liver. *School of Protein Science*:

3. Avtandilyan N. V., Karapetyan S. A., Davtyan M. A., The change of kinetics of nonureotelic arginase under influence of exogenous polyamines in rat brain and kidney. International young scientists conference "Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology 3", Yerevan, Armenia, 26-29 September 2012, pp. 48-52.

4. Avtandilyan N. V., Karapetyan S. A., Davtyan M. A., Polyamines are noncompetitive inhibitors for nonureotelic arginases in the different tissues of rats. *National Academy of Sciences of RA, Electronic Journal of Natural Sciences*, 1 (20), 2013, pp. 7-10.

5. Avtandilyan N. V. The research of the role of nonureotelic arginases in polyamines biosynthesis in brain and kidney *in vitro*. *Biolog. Journal of Armenia*, 1 (65), 2013, pp. 26-32.

6. Автандилян Н. В. Регуляторная роль неуреотелической аргиназы печени в биосинтезе полиаминов. 17-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 22 - 26 апрель 2013 г.). Сборник тезисов, ст 165.

АВТАНДИЛЯН НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

РОЛЬ УРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ И НЕУРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ АРГИНАЗ В БИОСИНТЕЗЕ ПОЛИАМИНОВ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: аргиназа, полиамины, изоферменты, неконкурентное ингибирование

Полиамины гидрофильные, поликатионные соединения, которые имеют широкое биологическое распространение [Pegg A. E. 1982; Pekka Kilpelainen 2002]. Путресцин, спермидин и спермин главные из полиаминов, которые встречаются во всех клетках эукариот и прокариот. Показано, что путресцин продукт декарбоксиляции орнитина, а спермидин и спермин синтезируются спермидин и спермин синтазами при участии S-аденозилметионина. Долгое время отсутствовали данные о биологической роли полиаминов. В последние годы возрос интерес к роли и синтезу полиаминов, учитывая, что полиамины играют важную роль в стабилизации структуры ДНК. Вскоре было опубликовано множество исследований о разносторонней биологической роли полиаминов. В частности, они участвуют в стабилизации структуры мРНК и мембран, имеют важную роль в процессах транскрипции, трансляции и апоптоза, модулируют структуру хроматина, воздействуют на рецептор-лиганд взаимодействие, передачу сигнала, работу ионных каналов, на рост и движение клетки, на процессы дифференциации и пролиферации, регенерацию и рост нейронов [Kuiper M. A. 2000; Lange P. S. et al., 2004; Bachrach U. 2001; Bachetti T. 2004; Cai D. Et al., 2002; Camon L. 2001; Dagostino et al., 2002; Deignan J. L. et al., 2008; Devens B. H. Et al., 2000; Filbin M. T. 2003; Gerner E. W. 2004; Liu L. 2003, 2005]. Должны отметить, что еще не выяснены некоторые вопросы касающиеся биосинтеза полиаминов. Остается не изученным тип первого фермента синтеза полиаминов (уреотелический или неуреотелический изофермент аргиназы). Еще в 1967 году была предложена гипотеза, согласно которой в биосинтезе полиаминов участвует неуреотелическая аргиназа [Давтян М. А. 1966, 1967, 1970].

В данной диссертации было исследовано участие уреотелической и неуреотелической аргиназ в биосинтезе полиаминов. Для этого была изучена кинетика ингибирования аргиназ полиаминами. Показано, что полиамины ингибируют активность неуреотелической аргиназы, не воздействуя на активность уреотелической аргиназы. Было выяснено, что полиамины ингибируют неуреотелическую аргиназу механизмом неконкурентного ингибирования. Они ингибируют активность аргиназы воздействуя на стереоспецифичный участок фермента, находящийся вне активного центра. Уреотелический изофермент

аргиназы, который встречается только в печени уреотелических организмов, не имеет специального центра для связывания полиаминов. С помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии было доказано, что в печени существует один уреотелический и два неуреотелических изофермента, в почках два неуреотелических изофермента, в головном мозгу один неуреотелический изофермент.

После фракционирования аргиназ, в инкубационную среду изоферментов были добавлены полиамины. Механизм ингибирования был выявлен кривыми Лайнуивера-Берка и Михаэлиса-Ментена. Анализ кривых показал, что полиамины являются неконкурентными ингибиторами для неуреотелической аргиназы. В частности, было доказано, что разные изоферменты неуреотелической аргиназы разных органов имеют разные механизмы неконкурентного ингибирования. После гель-фильтрации гомогенатов тканей, первый неуреотелический изофермент аргиназы печени, второй изофермент почек и мозга ингибируются механизмом смешанного типа. Первый изофермент неуреотелической аргиназы почек после гель-фильтрации и второй неуреотелический изофермент печени после ионнообменной хроматографии ингибируются бесконкурентным механизмом. При смешанном ингибировании полиамины связываются с ферментом и фермент-субстратным комплексом, во время бесконкурентного ингибирования полиамины связываются только с фермент-субстратным комплексом. В обоих случаях полиамины связываются с аллостерическим центром аргиназы, который находится вне активного центра. Анализ полученных данных показал, что все изоферменты неуреотелической аргиназы имеют разные значения K_m и K_i . Можно утверждать, что в печени, почках и мозге крыс находятся разные изоферменты аргиназы, которые, несомненно, имеют разные метаболические функции. Доказано, что уреотелическая аргиназа, которая находится в печени, не ингибируется полиаминами, следовательно не участвует в биосинтезе полиаминов. Что касается изоферментов неуреотелической аргиназы, то они ингибируются полиаминами и участвуют в биосинтезе полиамнов, синтезируя орнитин для орниииндекарбоксилазы.

Естественно, возникает вопрос о различии в кинетике ингибирования изоферментов неуреотелической аргиназы. Можно отметить, что один или несколько изоферментов неуреотелической аргиназы могут участвовать в биосинтезе пролина, NO, гуанидиновых соединений (креатин) и аргинин-богатых гистонов. Логично, что изоферменты неуреотелической аргиназы имеют разные центры для связывания полиаминов и разные механизмы ингибирования. Эти вопросы могут быть уточнены в будущем, в новых исследованиях.

AVTANDILYAN NIKOLAY
THE ROLE OF UREOTELIC AND NONUREOTELIC ARGINASES IN POLYAMINES
BIOSYNTHESIS
SUMMARY

Keywords: arginase, polyamines, isoenzymes, non-competitive inhibition

Polyamines of which are spermine, spermidine and putrescine, are positively charged hydrophilic organic compounds of a low molecular weight that have wide biological distribution and are presented almost in all organisms [Pegg A. E. 1982; Pekka K. 2002]. Putrescine is a product of L-ornithine decarboxylation, it also attack decarboxylated S-adenosylmethionine and gets converted to spermidine, then to spermine [Morris Jr., S. M. 2009; Kristina K. 2010]. Although the actual functions of these amines are still not entirely clear at the molecular level, recent studies have shown that in normal cell DNA stabilization require polyamine, what highly increased the interest to these molecules. Polyamines play multiple roles in different biological processes, including processes of cell growth, proliferation and differentiation, RNA structure's stabilization, transcription and translation, apoptosis, chromatin structure's modulation, receptor-ligand

interaction, neuronal regeneration and development [Kuiper M. A. 2000; Lange P. S. et al., 2004; Bachrach U. 2001; Bachetti T. 2004; Cai D. Et al., 2002; Camon L. 2001; Dagostino et al., 2002; Deignan J. L. et al., 2008; Devens B. H. Et al., 2000; Filbin M. T. 2003; Gerner E. W. 2004; Liu L. 2003, 2005]. Meanwhile it should be noted that it is not yet clear the key issues of polyamine biosynthesis, including the character (ureotelic or non ureotelic) of the first enzyme, which is arginase. Back in 1967s there was a hypothesis, that nonureotelic arginase involved in polyamines biosynthesis [Davytan M. A. 1966, 1970].

This dissertation outlines the participation of ureotelic and nonureotelic arginase isoenzymes in biosynthesis of polyamines. On this occasion was investigated the kinetics of arginase inhibition by polyamines in details. We clearly show the inhibition of nonureotelic arginase by polyamines, meanwhile the ureotelic isoenzyme show entire tolerance. Inhibition of nonureotelic arginase under the influence of polyamines has noncompetitive nature of inhibition. In another words polyamines inhibit the enzyme binding in the other regulatory part of the enzyme distinct from the active site. While the ureotelic arginase, which is presented only in the liver of ureotelic organisms, does not have any analogous regulatory center.

In our previous studies we studies and investigates all known isoenzymes of arginase in various organs of rats. Through the gel-filtration and ion-exchange chromatography was shown the existance of 1 ureotelic and 2 nonureotelic isoenzymes of arginase in liver, 2 nonureotelic isoenzymes in kidney and 1 nonureotelic isoenzyme in brain. The mechanisms of the inhibitions under the influence of polyamines which are described in this dissertation were clarified through the dependence of enzymatic reaction's velocity and substrate's concentration inverse values in Lineweaver-Burk curve.

Analysis of equations of non ureotelic arginase enzymatic reactions velocity and the dependence of L-arginine concentration in Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk curves in the presence and absence of polyamines, clarified that polyamines inhibit the activity of non ureotelic arginase in different types of non competitive mechanism. It was confirms that the first isoenzyme of arginase in liver, second isoenzymes in brain and kidney (after gel-filtration with sephadex G-100) are inhibited with exogenous and endogenous polyamines by mixed type inhibition mechanism. The second isoenzyme of nonureotelic arginase in liver (after ion-exchange chromatography of high-molecular fraction of liver with CM-cellulose) and first isoenzyme in kidney (from gel-filtration) are inhibited with exogenous and endogenous polyamines by the mechanism of uncompetitive inhibition. According to literature data analysis we can mention, that during the mixed type inhibition polyamines are connected as with non ureotelic arginase as so as with non ureotelic arginase-arginine complex, and what refers to uncompetitive mechanism, polyamines are connected to enzyme-substrate complex.

Analyses of the results show that the nonureotelic isoenzymes of arginase with different types of inhibition mechanisms differ from each other with K_m and K_i values.

We can summarize and emphasize, that the studied organs contain different isoenzymes of arginase, which undoubtedly has various metabolic functions. It was confirmed that liver ureotelic isoform of arginase don't participate in the biosynthesis of polyamines, because it is not inhibited in the presence of polyamines. Non ureotelic isoenzymes of arginase take part in the biosynthesis of polyamines, because they are inhibited under the influence of polyamines. Naturally, occurs a question about the kinetic differences between nonureotelic isoenzymes of arginase during the inhibition by polyamines. We should also mention that one or more of these isoenzymes can participate in biosynthesis of proline, NO, guanidine compounds (creatin) and histones. It is logical that this different isoenzymes involved in mentioned processes have different binding sites for polyamines and various types of inhibition mechanisms. Further investigation should be done to lighten questions mentioned above.