

Г. Т. АДУНЦ

О ВИДОВЫХ ОТЛИЧИЯХ ФОСФОМОНОЭСТЕРАЗ

Фосфомоноэстеразы широко распространены как в животных, так и в растительных организмах. Их деятельность проявляется почти во всех живых клетках.

Помимо широкого распространения фосфомоноэстераз, они имеют большой диапазон деятельности в отношении ряда субстратов, отщепляя фосфорную кислоту от различных фосфомоноэстераз. Эти субстраты могут быть как циклическими, так и ациклическими соединениями. Деятельность фосфомоноэстераз проявляется при самом различном оптимуме рН, что и является основой для классификации фосфомоноэстераз на отдельные группы [1, 2], как-то: фосфатазы, действующие при рН—9,0 и 6,4, и фосфатазы, действующие при рН—4,0 и 5,5. Таким образом, фосфатазы согласно оптимуму рН, при котором проявляется их активность, подразделяются на группу фосфатаз, действующих в щелочной среде, и группу фосфатаз, действующих в кислой.

Специфичность фосфомоноэстераз в некоторой мере проявляется в отношении их ингибиторов, к числу которых относятся соли щавелевой кислоты, фтористый натрий, сернистый натрий, цианистый калий, трихлорацетат, фторидзин, борат, этилендиаминтетрацетат, тиогликолят, бензилгистидин и др. [3—8]. 0,01—0,001 М раствор натриевой соли щавелевой кислоты тормозит активность фосфатаз как в костной ткани, так и в белых кровяных тельцах; слабее этот эффект проявляется в отношении фосфатаз в печени и почках и совершенно не проявляется в отношении кишечной фосфатазы. Ингибирующее действие фтористого натрия проявляется слегка в отношении костной, кишечной и печеночной фосфатазы.

Действие ингибиторов на фосфомоноэстеразы вносит определенную ясность в изучение динамики этих ферментов в различных органах животного.

Широкий диапазон действия фосфомоноэстераз в отношении отдельных субстратов и различных оптимумов рН привел исследователей к тому заключению, что эти ферменты не являются специфическими. Следует отметить, что в этой связи до сих пор отсутствуют исследования по выявлению биологических особенностей и различий в действии подобных неспецифических ферментов в различных органах животного и в одних и тех же органах различных животных.

Перед нами была поставлена задача изучить особенности действия фосфомоноэстераз на определенный субстрат в различных органах одного и того же животного и в одних и тех же органах различных животных в зависимости от их видовой принадлежности.

Экспериментальная часть. Опыты ставились на гомогенатах печени и почек белых крыс и кроликов. В качестве субстрата для изучения действия фосфомоноэстераз использовался бета-глицерофосфат натрия. Активность кислой и щелочной фосфатаз определялась по методу Боданского [9, 10], который вкратце сводится к следующему: на пять мл субстрата с медиаловым буфером рН-9, добавлялся один мл разбавленного гомогената и через одночасовую инкубацию при 37° ферментативное действие приостанавливалось добавлением одного мл 40% трихлоруксусной кислоты. После фильтрации из прозрачного фильтрата бралось по два мл и в нем определялся неорганический фосфор по методу Ловри и Лопеса [10]. Интенсивность окрашивания измерялась на электрофотоколориметре (ФЭК-М1 фильтр красный).

Средой для кислой фосфатазы служил медиал-уксуснокислый буфер с рН—4,45 со временем инкубации равным одному часу.

Остальные манипуляции были теми же, что и при определении щелочной фосфатазы.

Пробы печени и почек белых крыс и кроликов гомогенизировались в условиях низкой температуры, разводились дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы каждый мл гомогената соответствовал 30—40 мг ткани.

В семь параллельных пробирок бралось по 1 мл указанного гомогената; первые две пробы служили контролем; из оставшихся пяти проб четыре подвергались 10-минутной температурной обработке в следующем порядке: первую пробу при 50°C, вторую—60°C, третью—70°C, четвертую—80°C. Пятая проба не подвергалась температурному воздействию. После температурной обработки содержимое всех пробирок быстро охлаждалось и во все пробирки (кроме контрольных) прибавлялось 5 мл субстрата, приготовленного на буфере, после чего пробирки инкубировались при 37°C в течение 1 ч. Наряду с этим в тех же условиях производилась инкубация в отдельности субстрата и гомогената с целью выявления спонтанного расщепления субстрата и лабильного фосфора гомогената. После приостановления ферментативного действия ТХУ кислотой, определялся отщепившийся неорганический фосфор.

Проведенные исследования показали, что активность щелочной фосфатазы печени белых крыс колеблется в пределах 0,5—1,7 мг фосфора на 1 г ткани, а средняя арифметическая составляет 0,985 мг фосфора (табл. 1).

Активность щелочной фосфатазы печени кроликов проявляется в более ярко выраженной форме и колеблется в пределах 4,5—6,5 мг. Сравнивая активность щелочной фосфатазы печени белых крыс с такой же печени кроликов, можно заключить, что активность фосфатаз печени кроликов (табл. 2) в 6 раз выше, чем активность этого фермента в том же органе у крыс. Что касается кислой фосфатазы, то активность ее в печени белых крыс примерно в 6 раз превалирует над активностью щелочной и колеблется в пределах 4—7 мг; средняя же арифметическая составляет 5,911 мг.

Активность фосфатаз печени и почек крыс до и после температурной обработки.
Количество освободившегося фосфора в мг, от β -глицерофосфата натрия 1 г ткани за час инкубации

		О п ы т ы											% соотноше- ния от перво- начальной активности	
		I	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		среднее
П е ч е н ь														
До обработки		$\frac{a}{b}$	—	0,887	0,500	0,875	0,750	0,750	—	1,500	0,875	1,725	0,985	100
		$\frac{a}{b}$	—	5,000	4,875	3,875	4,750	4,750	—	6,625	6,875	7,250	5,911	100
После обработки	50	$\frac{a}{b}$	—	0,887	0,750	0,875	0,750	0,650	—	1,250	0,875	1,726	0,970	98
		$\frac{a}{b}$	—	3,500	4,125	3,625	6,125	3,500	—	4,375	4,625	5,500	4,487	75
	60	$\frac{a}{b}$	—	0,125	0,750	0,125	5,250	0,000	—	0,000	0,000	1,000	0,280	28
		$\frac{a}{b}$	—	2,375	2,125	1,875	3,000	1,500	—	2,875	1,375	3,125	2,300	41
П о ч к и														
До обработки		$\frac{a}{b}$	3,000	3,230	3,250	3,750	8,000	4,250	8,625	13,000	10,000	11,625	6,868	100
		$\frac{a}{b}$	6,250	6,120	6,500	5,500	6,875	5,870	2,750	7,000	5,500	6,875	5,924	100
После обработки	50	$\frac{a}{b}$	5,625	5,250	7,250	7,500	8,750	4,750	9,375	13,250	11,250	12,375	8,537	124
		$\frac{a}{b}$	4,875	6,875	6,875	4,875	5,875	7,875	5,625	6,000	5,000	5,500	5,937	100
	60	$\frac{a}{b}$	0,375	0,875	1,250	1,125	2,125	2,500	0,000	3,375	1,250	1,875	1,475	24
		$\frac{a}{b}$	3,625	3,125	1,375	3,000	3,875	1,125	2,750	3,125	2,750	3,525	2,727	46

a — активность щелочной фосфатазы,

b — активность кислой фосфатазы.

Активность кислой фосфатазы печени кроликов проявляется приблизительно в 2,5 раза слабее по сравнению с таковой у белых крыс и колеблется в пределах 1,75—2,75 мг. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о различной активности кислой и щелочной фосфатазы в печени различных животных—кроликов и белых крыс. Если активность щелочной фосфатазы печени кроликов проявляется в более ярко выраженной форме, а кислой—в умеренной, то у белых крыс наблюдается обратная картина, т. е. имеет место слабое проявление активности щелочной фосфатазы и, наоборот, высокая активность кислой фосфатазы. Надо полагать, что указанные отличия активности фосфатаз связаны с видовыми особенностями подопытных животных.

Таблица 2

Активность щелочной и кислой фосфатаз печени и почек кролика до и после температурной обработки
Количество освобожденного фосфора в мг от β -глицерофосфата натрия на г ткани за час инкубации

		Опыты							% соотно- шение от первоначальной ак- тивности
		I	II	III	IV	V	среднее		
Печень									
До обработки		а	5,062	6,875	5,250	4,000	4,375	5,112	100
		б	1,750	1,375	2,750	2,750	2,125	2,150	100
50		а	5,375	6,875	5,375	4,125	4,375	5,225	102
		б	1,500	0,750	2,000	2,125	1,375	1,552	72
После обработ- ки	60	а	5,375	3,500	5,375	3,500	2,750	4,100	82
		б	0,750	0,000	1,500	1,000	0,500	0,750	34
70		а	2,500	3,625	3,375	0,250	1,125	2,175	42
		б	0,250	0,000	1,250	0,000	0,000	0,300	14
Почки									
До обработки		а	6,625	6,500	9,375	9,750	9,625	8,375	100
		б	2,000	2,000	2,375	2,125	2,375	2,175	100
50		а	6,500	9,750	12,375	11,000	10,125	9,950	118
		б	1,725	0,500	1,875	1,625	1,850	1,515	69
После обработ- ки	60	а	6,125	6,750	10,625	10,250	8,375	8,425	100
		б	0,625	0,500	1,375	1,000	0,625	0,825	37
70		а	2,500	3,375	4,875	0,875	3,750	3,075	36
		б	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,050	2

а— активность щелочной фосфатазы,

б— активность кислой фосфатазы.

Исследования, проведенные по изучению активности фосфатаз в почечной ткани крыс, показали, что активность щелочной фосфатазы в почках составляет 3—13 мг фосфора. Подобные колебания обусловлены, по всей вероятности, различным проявлением активности фермента у молодых и зрелых животных. У молодых белых крыс активность ще-

щелочной фосфатазы проявляется в более ярко выраженной форме, чем у зрелых. Средняя арифметическая активность щелочной фосфатазы составляет 6,868 мг, а кислой—3—6,8 мг со средним арифметическим 5,924 мг. Исследования показали, что активность щелочной и кислой фосфатазы почек белых крыс мало чем отличаются друг от друга и почти равны. У кроликов активность щелочной фосфатазы почек значительно превосходит таковую кислой фосфатазы и равняется 8,375 мг, в то время как активность кислой фосфатазы составляет 2,175 мг.

Приведенные выше результаты касаются гомогенатов, неподвергнутых температурной обработке, которые служат фоном для проб, подвергнутых температурной обработке. В наших исследованиях ферментативная активность гомогената, не подвергнутого температурному воздействию, принималась за 100%. Полученные данные приведены в табл. 1, 2, где показана динамика активности кислой и щелочной фосфатазы печени и почек белых крыс и кроликов до и после температурной обработки. Как видно из табл. 1, по мере повышения температуры, инактивация щелочной фосфатазы печени белых крыс возрастает. При 50°C активность фермента понижается на 2%, при 60°C—72%, а при 70°C имеет место полное инактивирование фермента. Активность кислой фосфатазы печени белых крыс при 50°C понижается—на 25%, дальнейшая инактивация растет с повышением температуры. И в этом случае полная инактивация наступает при 70°C. Интересные результаты получены в отношении активности щелочной и кислой фосфатазы почек белых крыс. Как видно из той же таблицы, активность щелочной фосфатазы после температурного воздействия (50°C), вместо ожидаемого падения, повышается приблизительно на 24% по сравнению с исходной активностью; под воздействием 60°C отмечается резкое падение активности до 76%. Активность кислой фосфатазы после частичной инактивации при 50°C не подвергается заметным изменениям, ее активность сохраняется на исходном уровне; при 60°C отмечается падение активности кислой фосфатазы на 54%. Как показали наши исследования, 10-минутное нагревание фермента при 70°C во всех случаях ведет к его полной инактивации. Активность кислой фосфатазы после частичной инактивации при 60°C претерпевает меньше изменения, чем активность щелочной.

Изменения активности фосфоэстераз печени и почек кролика после частичной температурной обработки, приведены в табл. 2. Активность щелочной фосфатазы печени кролика после нагревания при 50°C либо не изменяется, либо же несколько повышается; после же нагревания при 60°C активность фермента понижается приблизительно на 18%, при 70°C активность фермента понижается примерно на 60% по сравнению с исходной. Наконец, при 80°C происходит полная утрата ферментативной активности.

Исследования, проведенные с кислой фосфатазой печени кроликов, показали, что активность ее понижается параллельно с повышением температуры, а именно: при 50°C потеря активности составляет 28%, при 60°C—66%, при 70°C—86% по сравнению с исходной ее активностью.

стью. Наши исследования показали, что температурное воздействие по-разному сказывается на активности щелочной и кислой фосфатаз почек кроликов. Так, например, после температурной обработки гомогената активность щелочной фосфатазы при 50°C не только не пони-

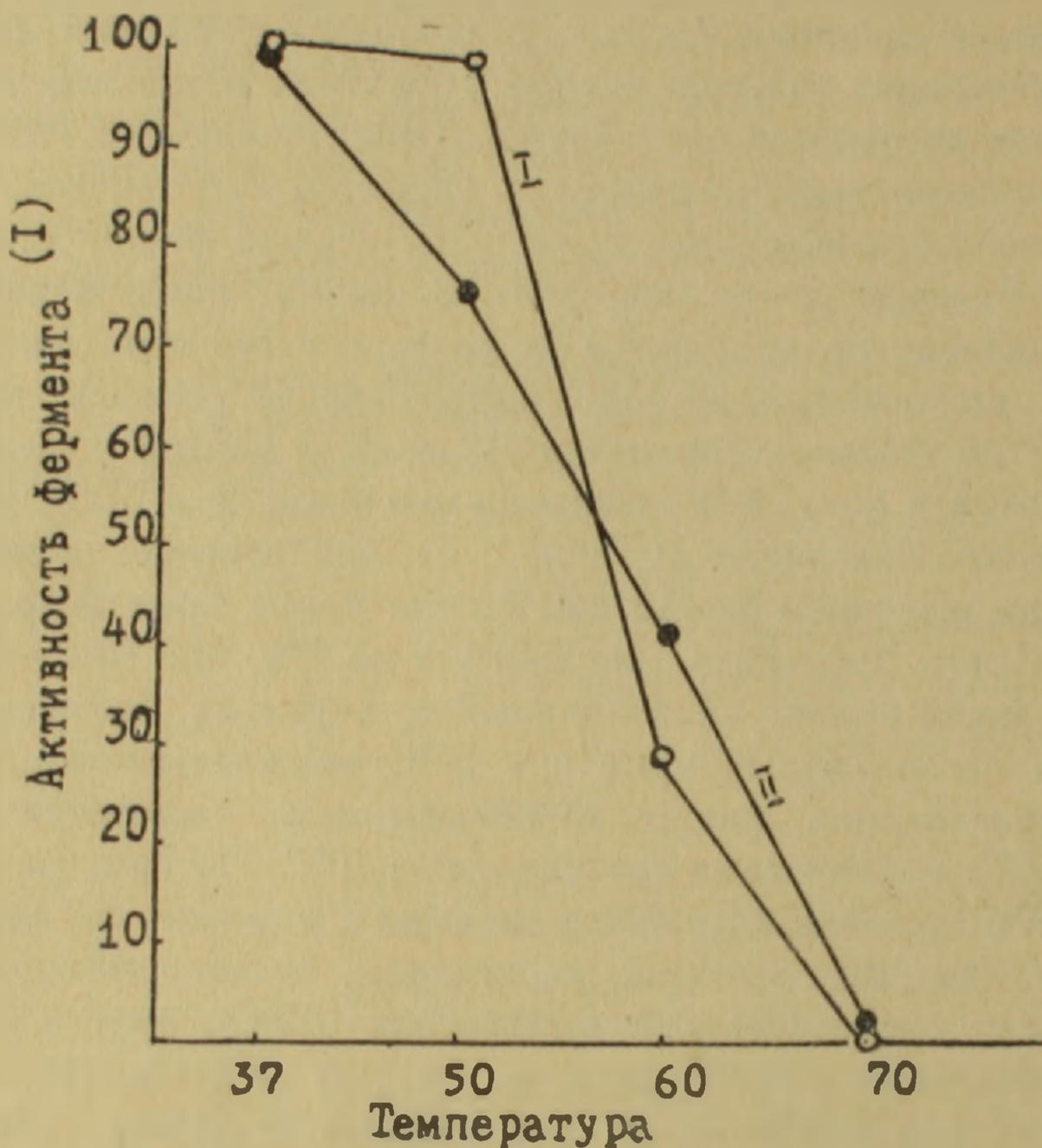


Рис. 1. Активность щелочной и кислой фосфатаз печени крыс: 1) щелочная фосфатаза, 2) кислая фосфатаза, (1) активность до температурного воздействия принято за 100%.

жается, а, наоборот, повышается приблизительно на 18%; 60°C почти не оказывает заметного воздействия на активность фермента; при 70°C обработке ферментативная активность полностью не инактивируется. Что же касается активности кислой фосфатазы, то она под действием температурного фактора последовательно понижается. Кислая фосфатаза почек кролика совершенно теряет свою активность после температурной обработки при 70°C, а щелочная фосфатаза в этих условиях сохраняет 36% своей первоначальной активности. С другой стороны, полученные результаты свидетельствуют о том, что щелочная фосфатаза печени и почек кролика более термостабильна, чем у белых крыс. Щелочная фосфатаза печени кроликов является более термостабильной, чем кислая. Интересная картина наблюдается в отношении щелочной фосфатазы белых крыс. Если разделить весь период температурной обработки на четыре этапа, а именно: первый—(50°C), второй—(60°C), третий—(70°C) и четвертый—(80°C), то, как видно из приведенных данных, в каждом отдельном случае имеет место различное изменение ак-

тивности со стороны того или другого фермента. Так, например, в первом периоде щелочная фосфатаза оказывается более термостабильной, чем кислая; во втором этапе проявляется противоположный эффект—более выраженное угнетение активности щелочной фосфатазы по сравнению с кислой. В третьем этапе имеет место полная утрата активности как щелочной, так и кислой фосфатазы.

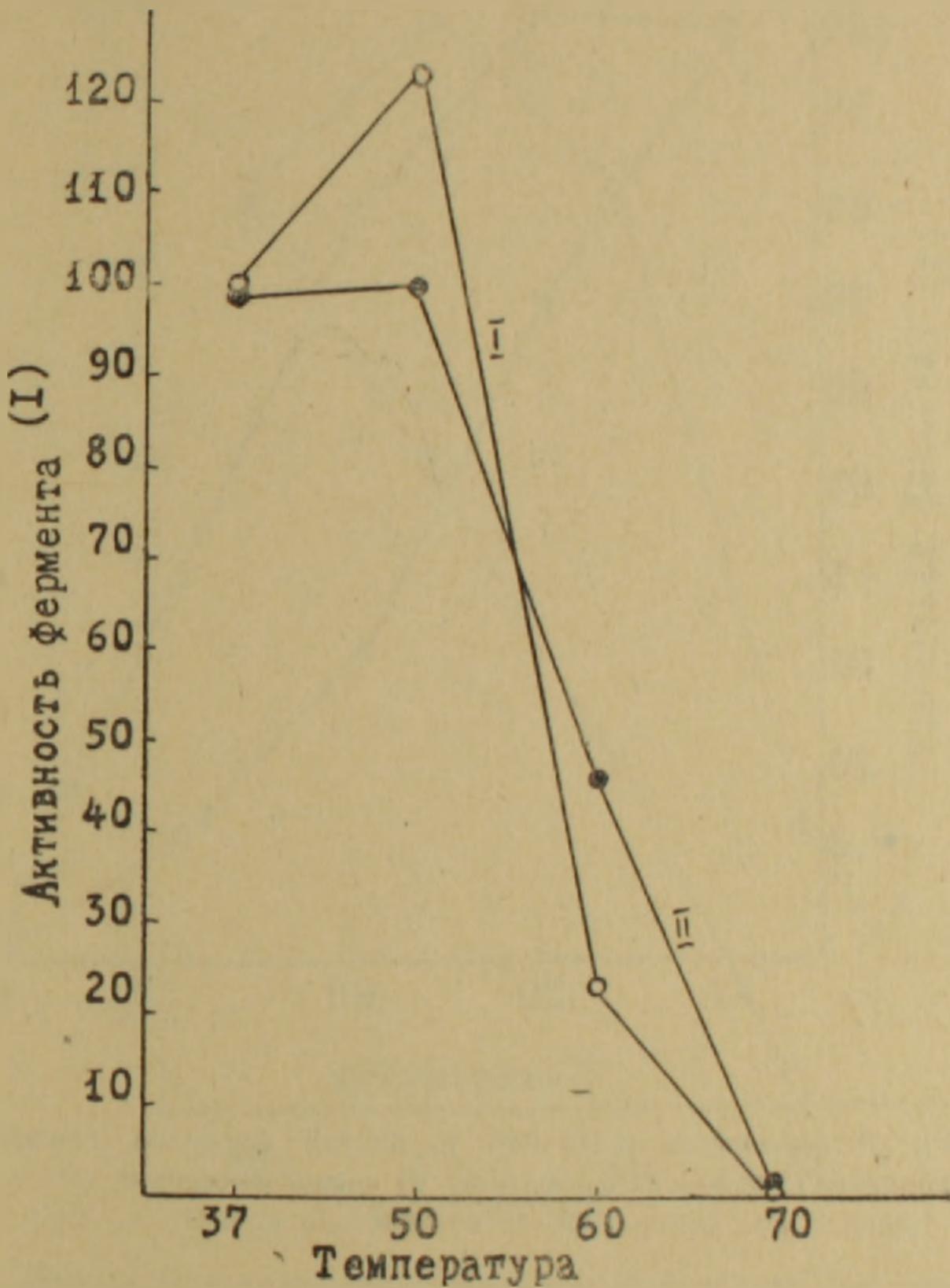


Рис. 2. Активность щелочной и кислой фосфатаз почек крыс: 1) щелочная фосфатаза, 2) кислая фосфатаза, (I) активность до температурного воздействия принята за 100%.

У кроликов отмечается меньшее падение активности щелочной фосфатазы в печени и почках при различных температурных обработках по сравнению с кислой фосфатазой. Таким образом, щелочная фосфатаза печени и почек кролика проявляет наибольшую активность и термостабильность, чем кислая фосфатаза кроликов и обе фосфатазы белых крыс. Метод температурной обработки дает нам возможность внести определенную дифференциацию в активность кислой и щелочной фосфатазы в различных органах одного и того же животного. Таким образом, нами был применен более или менее доступный метод, позво-

ляющий судить не только о величине активности отдельных фосфо-
ноэстераз, но и думать об их структурных отличиях.

Надо полагать, что белковые субстанции исследованных органов
(печень, почка) не находятся в эквивалентных взаимоотношениях, ибо
полученные нами данные свидетельствуют о различном изменении ак-
тивности исследованных фосфоэстераз при одинаковой термиче-

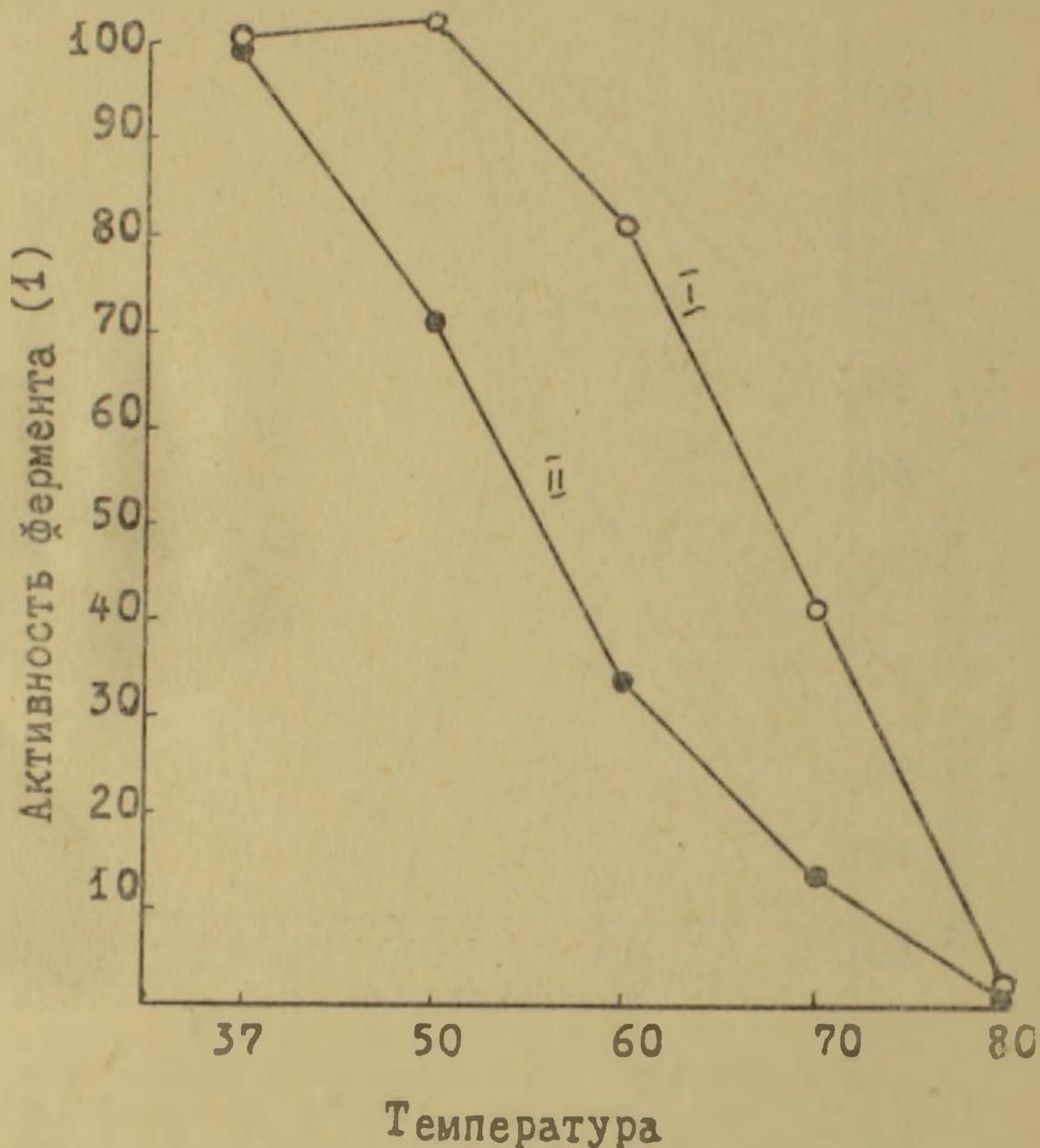


Рис. 3. Активность щелочной и кислой фосфатаз печени кролика: 1) щелочная фосфатаза, 2) кислая фосфатаза, (1) активность до температурного воздействия принято за 100%.

ской обработке. Представляет несомненный интерес вопрос о природе одного и того же фермента в одном и том же органе у различных представителей животного царства. Вопрос касается выяснения идентичности и эквивалентности биологических особенностей, структуры и химического строения этих ферментов в одном и том же органе различных животных. Представляло несомненный интерес выяснение вопроса, являются ли эти ферменты одними и теми же по своему строению в одинаковых органах различных животных, или роднятся между собой только однотипным отношением к субстрату. Для правильного понимания вопроса необходимо более близко подойти к следующему факту: предположим, что по своей природе щелочная фосфатаза печени и почек кролика и крыс идентична. В таком случае и отношение их к соответствующему субстрату должно быть одинаковым после частичной термиче-

ческой обработки, ибо следует полагать, что последняя во всех случаях и в одинаковой степени отразится на активности фермента. Однако, как показали наши исследования, такая температурная обработка неодинаково оказывается на активности фермента. Если после температурной обработки при 50°C щелочная фосфатаза печени кроликов активируется, то в тех же условиях активность этого фермента в печени белых

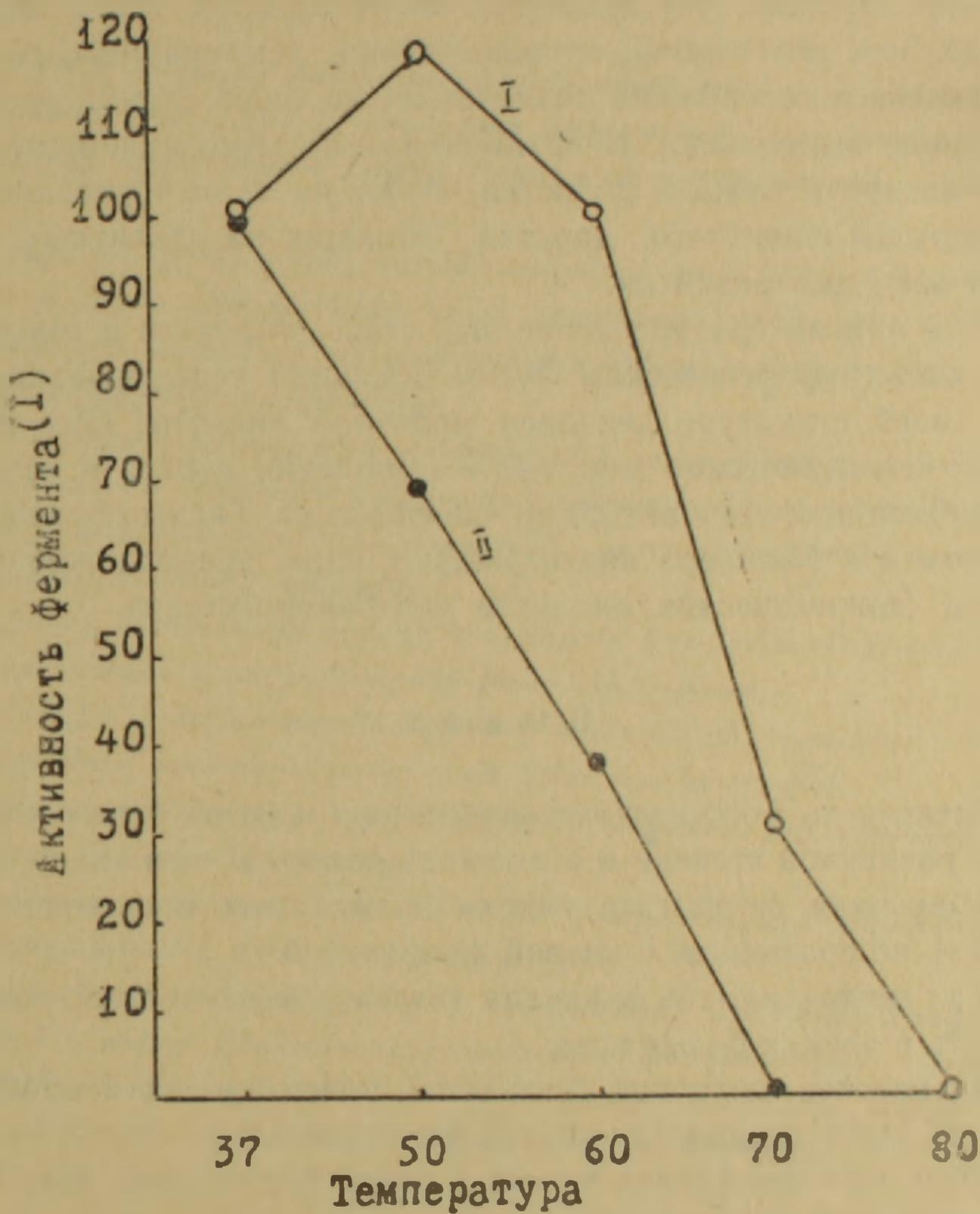


Рис. 4. Активность щелочной и кислой фосфатаз почек кролика. 1) Щелочная фосфатаза, 2) кислая фосфатаза, (1) активность до температурного воздействия принята за 100%.

крыс понижается, при 60°C термической обработке отмечается падение активности щелочной фосфатазы печени кроликов приблизительно на 18%, в то время как активность этого же фермента в печени белых крыс при той же температуре понижается на 72%. Представляет несомненный интерес и тот факт, что термическая обработка при 70°C снижает активность щелочной фосфатазы печени кролика на 60%, тогда как у белых крыс отмечается полная утрата ферментативной активности.

Полученные нами результаты позволяют думать о том, что фосфатазы, особенно щелочная, в разных органах не всегда одинаковы. Раз-

личная степень инактивации фосфомоноэстераз одних и тех же органов различных животных при одинаковой температурной обработке дает основание предполагать, что они могут отличаться своими физико-химическими свойствами, что дает основание думать о существовании так называемых биохимических аналогов этих ферментов. Существование таких биологических аналогов хорошо известно в биологии еще с давних времен. Лучшим [11] примером могут служить такие переносчики кислорода, как гемоглобин, хлорокруолины, гемоцианины, гемоэритрины, являющиеся совершенно различными по своей структуре и химической природе веществами, но функционально объединяемыми благодаря их основной и важной функции—функции транспорта кислорода у представителей животного царства, стоящих на различных ступенях филогенетического развития.

В 1959 г. в литературе появилась статья Маркета и Мюллера [12], которые электрофоретическим путем доказали существование различных по своей структуре дегидраз молочной кислоты. Они проявляли идентично специфическое действие в отношении одного и того же субстрата и были прозваны авторами «изозимами». Таким образом, «изозимы» Маркета и Мюллера подтверждают наше предположение о существовании биохимических аналогов фосфомоноэстераз.

В ы в о д ы

1. Активность фосфомоноэстераз печени и почек белых крыс проявляется в различной степени в отношении одного и того же субстрата.
2. Щелочная фосфатаза печени белых крыс проявляет меньшую активность по сравнению с кислой фосфатазой.
3. Как щелочная, так и кислая фосфатаза проявляют наибольшую активность в почках белых крыс.
4. Активность щелочной фосфатазы почек кроликов приблизительно в 4 раза выше активности кислой фосфатазы.
5. Щелочная фосфатаза печени и почек белых крыс является более термостабильной, чем кислая.
6. Щелочная и кислая фосфатазы кроликов проявляют большую термостабильность, чем это имеет место у белых крыс.
7. Различие в характере температурной инактивации одних и тех же фосфомоноэстераз в одних и тех же органах различных животных может быть обусловлено различием в видовой специфичности этих ферментов.

Գ. Ք. ԱԴՈՒՆՅ

ՖՈՍՖՈՄՈՆՈԷՍՓԵՐԱԶՆԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ՏԱՐՔԵՐՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հիմնային և թթվային ֆոսֆատազաներն ունեն շատ լայն տարածում ինչ-
 ա՛ն ս կենդանական, այնպես էլ բուսական աշխարհում, բայց տարբեր կենդա-
 ների տարբեր օրգաններում նրանք հանդես են գալիս տարբեր ինտենսիվու-
 համբ:

Մեր առջև խնդիր ենք դրել ուսումնասիրելու նույն կենդանու տարբեր օր-
 տանների և տարբեր կենդանիների նույն օրգանների հիմնային և թթվային
 ֆոսֆատազաների ակտիվության փոփոխությունները՝ կախված ջերմային մաս-
 նակի ինակտիվացիայի աստիճանից:

Ուսումնասիրվել են սպիտակ առնետների և ճագարների լյարդի և երիկամ-
 ների հոմոգենատում հիմնային և թթվային ֆոսֆատազաների ակտիվության փո-
 փոխությունը՝ կախված ջերմային մասնակի ինակտիվացիայի աստիճանից:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ՝

1. Սպիտակ առնետների լյարդի և երիկամի ֆոսֆոմոնոէսթերազների ակ-
 տիվությունը հանդես է գալիս տարբեր ինտենսիվությամբ:
2. Հիմնային ֆոսֆատազան սպիտակ առնետների լյարդում հանդես է
 գալիս ավելի թույլ ակտիվությամբ, քան թթու ֆոսֆատազան:
3. Սպիտակ առնետների երիկամներում ֆոսֆոմոնոէսթերազները հանդես
 են գալիս շատ մեծ ակտիվությամբ:
4. Ճագարների երիկամների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը 4
 անգամ գերազանցում է թթու ֆոսֆատազային:
5. Սպիտակ առնետների լյարդի և երիկամների հիմնային ֆոսֆատազան
 հանդիսանում է ավելի թերմոստաբիլ, քան թթու ֆոսֆատազան: Ճագարների
 լյարդի և երիկամների հիմնային և թթվային ֆոսֆատազաները ավելի թերմոս-
 տաբիլ են, քան սպիտակ առնետների ֆոսֆոմոնոէսթերազները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Folley S. J. und Kay H. D. *Ergeb. Enzymforsch.* 5, 159, 1936.
2. Bamann E. a. Meisenh zimer M. В книге Bamann Myrbuck die Methoden der
 Fermentforschung, 1603, 1940.
3. Покровский А. А. *Вопросы мед. химии*, т. 6, вып. 3, 1960.
4. Roche L a r o m i n g u i e r e S. a. L o r e e r e n s A. *Compt. rend. Soc. biol.* 137,
 243, 1943.
5. Belfanti S., Contarti A. a. Ercoli A. *Biochem. J.*, 29, 517, 1933.
6. Belfanti S. Contarti A. a. Ercoli A. *Biochem. J.* 29, 842, 1933.
7. Beck L. V. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 49, 435, 1942.
8. Patwardhan V. W. *Biochem. J.* 31, 560, 1937.
9. Bodansky O. *J. Biol. Chem.* 101, 93, 1933.
10. Lowri H. a. Lopez J. J. *Biol. Chem.* 162, 421, 1946.
11. Флоркен М. *Биохимическая эволюция иност. лит. М.*, 1947.
12. Markert Clement L. a. Moller Freddy. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. w. S.*
 45, 753, 1959.