

ՀԱՄԱՌՈՑ ԳԻՏԱԿԱՆ ՀԱՂՈՐԴՈՒՄՆԵՐ

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

ՖՈՍՖՈՐՈՏԵԻՆՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՏԱՐԲԵՐ
ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱՄՔՆԵՐՈՒՄ

Ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի հատկությունների և ազդեցության մեխանիզմի ուսումնասիրությունը կարևոր նշանակություն ունի, քանի որ այն սերտորեն կապված է հյուսվածքներում ֆոսֆոպրոտեինների ֆոսֆորի օգտագործման ուղիների հայտնաբերման հետ:

Առաջին անգամ 1940 թ. Տրավիան և Վերոնեզեն [1] ցույց տվեցին, որ կազմինը կենդանիների հյուսվածքային հոմոգենատում կարող է ֆոսֆատազաներով ենթարկվել դեֆոսֆորիլացման: Հատուկ ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազաների մասին ավելի ճշգրիտ տվյալներ ստացավ Հարրիսը [2]: Ուսումնասիրելով գորտի ձվերի ֆերմենտները, նա հայտնաբերեց մի նոր ֆերմենտ, կամ ֆերմենտներ, որոնք ընդունակ են ամրոզական սպիտակուցային մոլեկուլից, առանց նախնական պրոտեոլիզի, ճեղքել անօրգանական ֆոսֆատը:

Հետագայում ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազաների (ՖՊՖ-ազա) ակտիվություն նկատվեց մի քանի ձկների ձկնկիթներում [3], հավի բեղմնավորված ձվի մեջ [4] և մի շարք կաթնասուն կենդանիների հյուսվածքներում՝ առնետի փայծաղում [5, 6], լյարդում [5, 6, 7, 8], երիկամներում [5, 6], սրտում [5], ուղեղում [5] և արդանդում [9], ինչպես նաև եզան փայծաղում [10, 11, 12, 13], հորթի [14], ծովախոզուկի [5], մկան և ճագարի [5] հյուսվածքներում և այլն: Աքսելրոդը [15] ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվություն հայտնաբերեց ցիտրուսայինների պտուղներում, իսկ Կամարը, Սանդարարաջանը և Սարման [16]՝ ձիթատու բույսերի սերմերում:

Ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվությունը մենք որոշել ենք ողնաշարավոր կենդանիներից՝ կատունների, ճագարների, սպիտակ առնետների և անողնաշարավորներից՝ անատամների (Anodonta) հյուսվածքներում: Ֆերմենտը որոշել ենք բոտ Ֆուլթ-Քայնդի [17] և Ֆայնշտեյն-Ֆուկի [5] նկարագրած մեթոդի՝ որոշ փոփոխություններով: Այս մեթոդը հիմնված է ֆոսֆոպրոտեիններից (կաթի կազերն, ձվի ֆոսֆոպրոտեիններ՝ օվալբումին, վիտելլին, վիտելլենին և ֆոսովիտին) ՖՊՖ-ազայի ճեղքած ստույգ անօրգանական ֆոսֆորի քանակի վրա:

Ֆուլթը և Քայնդը, Ֆայնշտեյնը և Ֆուկը ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը որոշել են կիրառելով հյուսվածքի աղետոնային բուֆերով կատարվող էքստրակցիա, աղետոնով և ծծմբաթթվային ամոնիումով ֆրակցիոնային նստե-

* Աշխատանքը կատարված է ֆերմենտների լաբորատորիայում Գ. Թ. Աղունցի դեկանատու թյաժր:

ցում: Այս ճանապարհով ստացված ֆերմենտի ացետոնային փոշին հյուսվածքի նախնական ֆերմենտի ակտիվության համեմատությամբ բավական ակտիվ է: Եղել և կազդեցի ու ֆոսֆատներից ճեղքել է ֆոսֆորը: Հյուսվածքի ացետոնային փոշու փոխարեն մենք օգտագործել ենք նրա թափում համոզենատը (1 մաս հյուսվածքը նոսրացված 10 մաս թորած ջրում):

Որպես սուրստրատ օգտագործել ենք կաթի սպիտակուցը՝ կազդեցի: Պետք է նշել, որ առաջին անգամ Միլլենդերին [18] և Ուորեներին [19] հաջողվեց էլեկտրոֆորետիկ ճանապարհով ստանալ կազդեցիի երեք ֆրակցիաներ՝ α , β և γ : Պարզվեց նաև, որ այդ ֆրակցիաները համապատասխանաբար սլարուսակում են 0,96, 0,52 և 0,1% ֆոսֆոր: Ուրեմն, ՖՊՖ-ազայի ավելի բարձր ակտիվություն կարող է ի հայտ գալ α ֆրակցիայի մոտ, իսկ ավելի ցածր՝ γ -ի մոտ: Պոստերնակը [20] ցույց տվեց, որ կազդեցի ֆոսֆատային կորիզը կազմված է սերինֆոսֆատի մնացորդներից, որտեղ ֆոսֆորը սերինին միացած է եթերային տիպի կապով: Ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազան ճեղքում է հենց այդ եթերային կապերը:

Մի շարք հեղինակներ [24, 25, 26] հաստատեցին, որ կաթնասուն կենդանիների հյուսվածքների, մի քանի ձկների ձկնկիթների և գորտերի ձվերի ՖՊՖ-ազան օժտված չէ արտահայտված յուրահատկությամբ: Նրա գործունեության սուրստրատ կարող են լինել ինչպես տարրեր ֆոսֆոպրոտեինները, այնպես էլ ֆենիլֆոսֆատը և անօրգանական պիրոֆոսֆատը: Բայց ՖՊՖ-ազան չի ազդում դիֆերոֆոսֆատի, սերինֆոսֆատի և տրեոնինֆոսֆատի վրա: Մենք կազդեցիներ պատրաստում ենք բորապային բուֆերի վրա, որի $pH=6,1-6,2$, իսկ կոնցենտրացիան՝ 10 մլգ կազդեցի 1 մլ-ում: Դրա համար 100 մլգ կազդեցի ւրիվ լուծում ենք 5 մլ հիմնային բորատի մեջ և հետո զգուշությամբ, կաթիլներով ավելացնում 5 մլ 0,1 HCl: Ստացված լուծույթի pH -ը կլինի մոտ 6,0—6,1: Սուրստրատի անհրաժեշտ pH -ի ապահովումը կարևոր է ճիշտ տվյալներ ստանալու համար, որովհետև հայտնի է, որ կազդեցի և էնզոգեն սուրստրատների կենդանական հյուսվածքների ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայով ճեղքման օպտիմում pH -ը տատանվում է բավական նեղ սահմաններում՝ 5,5—6,1 [20]:

Փորձի յուրաքանչյուր նմուշում կազդեցիբորապային սուրստրատից վերցրել ենք 5 մլ և ավելացրել 0,5 մլ հյուսվածքային համոզենատ, որը համապատասխանում է 50 մլգ թափում հյուսվածքի:

Ռեակցիոն խառնուրդը 1 ժամ տեղդությամբ, 37° -ում ենթարկել ենք ինկուբացիայի, որից հետո 10 րոպե դրել սառցաջրի մեջ: Սպիտակուցները նստեցրել ենք 40%-անոց եռլորթաքախաթթվով և ապա ֆիլտրել:

Փորձի հետագա ընթացքից պարզվեց, որ անօրգանական ֆոսֆորի քանակի որոշման համար ամոնիումի մոլիբդենատ և վիտամին C ավելացնելու դեպքում լուծույթում պղտորություն է առաջանում, որի հետևանքով կոլորիմետրելուց ստացվում են ոչ ճիշտ տվյալներ: Դրա համար փորձի մեթոդիկայում մենք մտցրել ենք որոշ ձևափոխություններ: Պղտորությունից ազատվելու համար նախ շեղոքացնում ենք լուծույթում եղած թթվությունը, քանի որ սպիտակուցները նստեցնելու համար CH_3COOH ավելացնելիս միջավայրը դառնում է ուժեղ թթվային: Չեղոքացումը կատարվում է 2,5 N NaOH-ով: Չեղոքացումից հետո ինդիկատորի՝ ֆենիլային կարմիրի վարդագույն դույնը դառնում է մուգ կարմիր: Այնուհետև շեղոքացված նմուշին իր ծավալի $1/5$ -ի շափով ավելացվում է 10%-անոց $CaCl_2$: Քլորային կալցիումը պատրաստվում է

հազեցած $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -ի վրա: Ստացված լուծույթը պիտք է ունենա 8,8 pH: Քյուրային կալցիումի ավելացումից հետո նմուշը 10 րոպե մնում է սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, որից հետո նրա մեջ դիտվում է անօրգանական ֆոսֆորի նստվածք, որը ցենտրիֆուգվում է: Նստվածքը լրիվ մաքրելու համար այն ողողում ենք 20%-անոց $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -ի լուծույթով: Այնուհետև քստացված նստվածքը լուծում ենք 2 մլ 0,1 N HCl-ի մեջ և ապա ըստ Հովրի ու Հոպենի [22] մեթոդի որոշում ստույգ անօրգանական ֆոսֆորը: Որոշումը կատարվում է ֆոտոէլեկտրական կոլորիմետրով (Ֆէկ):

Ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվությունը տարբեր կենդանիների հյուսվածքներում

Կենդանին	Փորձի №	Հյուսվածքը					
		Փայծաղ	Լյարդ	Երիկամներ	Ուղեղ	Մկաններ	Սիրտ
		մլգ/ք 1 գ թարմ հյուսվածքին					
Կատու	1	0,54	—	—	0,36	—	—
	2	0,62	—	—	0,44	—	—
Ճագար	1	0,40	0,24	0,24	0,24	0,21	—
	2	0,28	0,55	0,33	0,36	0,16	—
	3	0,50	0,38	0,60	0,48	0,13	—
	4	0,62	0,48	0,49	0,51	0,13	—
	5	0,54	0,40	0,43	0,56	0,23	—
	6	1,22	1,12	0,64	0,71	0,36	—
Սպիտակ առնետ . .	1	1,40	0,87	1,01	—	—	—
	2	0,62	0,51	0,93	—	—	—
	3	1,41	0,71	1,52	—	—	—
	4	1,36	0,42	1,14	—	0,50	0,32
	5	0,53	1,04	0,39	0,66	—	0,25
Անասամ°	1	—	—	—	—	0,32	—
	2	—	—	—	—	0,26	—

Փորձերից ստացված արդյունքները բերված են աղյուսակում: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտված է մլգ/ք-ի քանակով (անօրգանական ֆոսֆատի ձևով), որն ստացվում է կազեինի ճեղքումից 1 ժամվա ընթացքում, 37°C ջերմության պայմաններում, 1 գ թարմ հյուսվածքից:

Կատարված փորձերը ցույց են տալիս, որ ՖՊՖ-ազայի բարձր ակտիվությամբ օժտված են կենդանիների փայծաղը, ուղեղը, լյարդը, երիկամները, պակաս ակտիվություն նկատվում է մկանային և սրտային հյուսվածքներում: Կատուների փայծաղում ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվությունը տատանվում է 0,54—0,62, ճագարների մոտ՝ 0,28—1,22, սպիտակ առնետների մոտ՝ 0,53—1,41 մլգ/ք 1 գ թարմ հյուսվածքին: Ինչպես հրկում է, սպիտակ առնետների փայծաղում ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունն ավելի բարձր է, քան կատուների ու ճագարների մոտ:

Ճագարների լյարդում ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը հասնում է 0,24—1,12, իսկ սպիտակ առնետների մոտ՝ 0,42—1,04 մլգ/ք: Ճագարների երիկամներում մինիմում ակտիվությունը հասնում է 0,24, իսկ մաքսիմումը՝ 0,64 մլգ/ք, սպիտակ առնետների մոտ՝ 0,39—1,52:

ՖՊՖ-ազայի զգալի ակտիվություն նկատվում է ուղեղային հյուսվածքում: Կատուների ուղեղում այն տատանվում է 0,36—0,44, ճագարների մոտ՝ 0,24—0,71, իսկ առնետների մոտ՝ 0,66 մլգ/ք սահմաններում:

* Հյուսվածքի ինկուբացիան կատարվել է սենյակային ջերմաստիճանում (18°):

ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը որոշվել է նաև անատամի մոտ: Փորձի համար օգտագործել ենք նրա ոտքը: Անատամի մոտ ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը բավական ցածր է՝ $0,26—0,32$ մգ/ր: նկատի ունենալով, որ անատամը (երկփեղկանի փափկամորթների—*Lamellibranchiata* s. *bivalva* դասի ներկայացուցիչն է) ապրում է դանդաղ հոսող և սղմային հատակ ունեցող գետակներում ու լճերում [21], իսկ այդ ջրերում ջերմաստիճանը տատանվում է $10—15^{\circ}$ -ի սահմաններում, հետևաբար դա պետք է լինի նրա հյուսվածքային ֆերմենտի պորթունների օպտիմում ջերմաստիճանը: Ելնելով դրանից, ինկուբացիան կատարել ենք սենյակային ջերմաստիճանում (18°): Զուգահեռ նմուշներում համոզենալով ինկուբացիայի ենք 37°C -ում: Պարզվել է, որ 37°C -ում անատամի ոտի հյուսվածքի ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազան ավելի ակտիվ է դործել և այս դեպքում ակտիվությունը հասել է $0,44—0,46$ մգ/ր:

Այսպիսով, կատարված փորձերի արդյունքները հաստատում են Ֆայնշտեյնի և Ֆոլկի [5], Սանդարարաջանի և Սարմայի [6], Նորրերգի [8] և ուրիշների կողմից ստացված տվյալներն այն մասին, որ ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազային բարձր ակտիվությամբ օժտված են կենդանիների փայծաղի, լյարդի, երիկամների և ուղեղի հյուսվածքները, ցածր ակտիվություն ցուցաբերում են սրտի և մկանային հյուսվածքները: Փափկամորթ կենդանիների մոտ թեև թույլ, բայց նույնպես դիտվում է ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը:

Հայկական ՍՍՏ Գիտությունների ակադեմիայի

Բիոքիմիայի ինստիտուտ

Ստացվել է 15.11.1962 թ.

А. А. СИМОНЯН

ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Р е з ю м е

Мы определяли фосфопротеинфосфатазную активность в тканях кошек, кроликов, белых крыс и беззубок (*Anodonta*).

Активность фермента определялась по методу Фута-Кайнда и Файнштейна-Фолка с некоторой модификацией. Субстратом для определения активности фермента служил казеинборатный раствор (рН-6,0—6,1). Опыты проводились на гомогенате свежей ткани. Инкубация длилась в течение одного часа, при 37° . Активность фермента обозначена количеством мкг/р, отщепленного в виде неорганического фосфата от казеина за 1 час на 1 г свежей ткани.

Опыты показывают, что в селезенке кошек фосфопротеинфосфатазная активность колеблется в пределах $0,54—0,62$, у кроликов— $0,28—1,22$, у белых крыс— $0,53—1,41$ мкг/р на 1 г свежей ткани.

Как видно из полученных данных, активность фосфопротеинфосфатазы в селезенке белых крыс выше, чем у кошек и кроликов.

В печени кроликов активность фосфопротеинфосфатазы доходит до

0,24—1,12 մլգ/ր, у крыс—0,42—1,04. В почках кроликов активность фермента доходит минимум до 0,24, максимум—0,64 мlg/р, у белых крыс—0,39 и 1,52.

Значительная фосфопротеинфосфатазная активность наблюдается в мозгу; у кошек—0,36—0,44, у кроликов—0,24—0,71, у крыс—0,66 мlg/р.

Активность фосфопротеинофосфатазы у беззубок (при инкубации при комнатной температуре 18°) колеблется в пределах 0,26—0,32 мlg/р.

Таким образом можно заключить, что высокой фосфопротеинфосфатазной активностью обладают селезенка, печень, почки и мозг животных, в тканях сердца и мышц наблюдается слабая активность. У моллюсков, хотя и слабая, но замечается активность фосфопротеинфосфатазы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Travia L., Veronese A., Arch. sci. biol., 26, 438, 1940.
2. Harris D. L., I. Chem. 165, 541. 1946.
3. Татарская Р. И., Кафани К. А., Канопкайте С. И. Биохимия, 23, 527, 1958.
4. Foote M. W., Kind C. A., Arch. of Biochem. a. Biophys. 46, 254, 1953.
5. Feinstein R. N., Volk M. E., J. Biol. Chem., 177, 339, 1949.
6. Sundararajan T. A., Sarma P. S. Euzymologia, 18, 234. 1957.
7. Ливанова Н. Б. Биохимия, 22, 578, 1957.
8. Norberg B., Acta physiol. scand., 23, 205, 1951.
9. Davis J. S. Proc. soc. Exp. Biol. a. Med., 95, 247, 1957.
10. Sundararajan T. A., Sarma P. S., Current Sci., 22, 340, 1953.
11. Sundararajan T. A., Sarma P. S., Biochem. et biophys. acta, 13, 588, 1954.
12. Sundararajan T. A., Sarma P. S., Nature, 173, 685, 1954.
13. Sundararajan T. A., Sarma P. S., Biochem. J., 56, 125. 1954.
14. Roche J., Thoai N. van, Pin P., Compt. rend. Soc. biol., 147, 409, 1953.
15. Axelrod B. J., Biol. Chem., 167, 51, 1947.
16. Kumar K. S. V. S., Sundararajan T. A., Sarma P. S. Enzymologia, 18, 228, 1957.
17. Murray W., Foote, C. Albert Kind, Arch. of Biochem. a. Biophys. 46, 255, 1953.
18. Mellander O., Biochem. Z., 300, 249, 1939.
19. Warner R. C., J. Amer. Chem. Soc., 66, 1725, 1944.
20. Лисовская Н. П. и Ливанова Н. Б. Фосфопротеины, М., 20, 1960.
21. Аверинцев С. В. Зоология беспозвоночных, М., 402—403, 1952.
22. Lowry H. O., Lopez J. A., J. Biol. Chem. 162, 421, 1946.
23. Като Т. „Гифу ика дайгакү кие. Acta Scholae med. Gifu“, 7, No. 6 1574—1582 (на японск. яз., рез. англ.) 1959.
24. Hofman T., Biochem. J. 69, 135, 1958.
25. Hofman T., Biochem. J. 69, 139, 1958.
26. Sundararajan T. A., Sarma P. S., Biochem. J., 71, 537, 1957.