

Г. Т. АДУНЦ, Л. В. САРКИСЯН

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕВАНСКОЙ ХРАМУЛЫ

Нашими предыдущими исследованиями [1, 2] было показано, что щелочная и кислая фосфатазы печени и почек белых крыс и кроликов имеют неодинаковое отношение к термоденатурации. Щелочная фосфатаза печени и почек кроликов более термостабильна, а у белых крыс она термостабильнее кислой фосфатазы. Одновременно выяснилось, что амилазы, имеющие разное происхождение, также неодинаково относятся к термоденатурации [3].

Целью настоящей работы было выяснить: 1) изменение активности щелочной фосфатазы, пирофосфатазы и амилазы у хладнокровных животных (рыб) при различных температурных режимах; 2) изменение активности щелочной фосфатазы под влиянием адреналина и серотонина.

Проведенные в этом направлении исследования показали, что адреналин в концентрации 10^{-5} М подавляет активность щелочной фосфатазы печени кроликов, а его малые количества (10^{-4} — 10^{-5} М) повышают активность этого фермента в почках и тонких кишках белых крыс, почках цыплят, почках и печени кроликов. Адреналин не проявляет активирующего действия на деятельность щелочной фосфатазы печени цыпленка, печени и почек лягушек, а серотонин повышает активность щелочной фосфатазы почек и тонких кишок белых крыс, почек кроликов, а также почек и печени цыплят и не стимулирует активность фермента почек и печени лягушек [4].

Материалом для наших исследований служили севанские храмулы (когак). Печень рыб использовали для определения щелочной фосфатазы и пирофосфатазы, а желчь — для определения активности амилазы. Пробы печени и желчи брали у декаптивированных рыб в холодных условиях. Щелочную фосфатазу определяли по методу Боданского [5], а неорганический фосфор — Ловри и Лонеса [6]. Активность амилазы определяли по методу Смитта и Роя [7].

Для определения щелочной фосфатазы гомогенат печени разбавляли 1:10 и для каждой пробы брали по одному мл, прибавляя субстрат, приготовленный на медиаловом буфере, рН=9,6. Реакционную смесь инкубировали при разных температурах (17, 27, 37 и 47°C) в течение одного часа. Подобное увеличение температуры инкубации на 10° следовало цель вынести температурный коэффициент— Q_{10} . Активность фермента считали по количеству неорганического фосфора, отделившись от β -глицерофосфата Na в мг на один г свежей ткани.

Таблица 1

Влияние температуры на активность щелочной фосфатазы в печени рыбы храмули

Инкубация в течение часа при температуре							Инкубация в течение часа под влиянием $MgCl_2$ при температуре						
17°	Q_{10}	27°	Q_{10}	37°	Q_{10}	47°	17°	Q_{10}	27°	Q_{10}	37°	Q_{10}	47°
2,250	1,6	3,750	1,6	6,187	1,05	6,500	3,125	1,3	4,125	1,6	6,500	1,1	7,250
3,750	1,4	5,500	1,2	6,625	1,07	7,125	4,875	0,9	4,750	1,5	7,125	1,0	7,375
2,750	1,8	5,000	1,5	7,500	1,06	8,000	2,500	2,0	5,000	1,5	7,750	1,2	9,750
1,500	2,1	3,250	1,4	4,750	1,07	5,000	1,500	2,0	3,000	1,7	5,250	1,1	6,000
2,250	1,6	3,750	0,7	3,000	2,08	6,250	2,500	1,8	4,500	0,7	3,000	2,2	6,750
1,500	2	3,000	1,5	4,750	1,3	6,250	1,500	2,0	3,000	1,5	4,500	1,4	6,250
1,7		1,3		1,2		1,66		1,4		1,1			

Для определения неорганической пирофосфатазы, гомогенат печени готовили на 0,02 М медиаловом буфере с разбавлением 1 : 10, из которого брали по 1 мл; 4 мл 0,01 М медиал HCl буфера—pH 7,2; 1 мл 0,01 М $Na_4P_2O_7$; субстрата и 1 мл 0,01 М $MgCl_2$ в качестве активатора. Активность фермента определяли по методу Л. А. Генделя [8]. До добавления субстрата пробы с гомогенатами разделили на 3 группы: первую группу оставляли в качестве контроля, вторую группу проб нагревали 10 мин. при температуре 50°C, третью группу проб нагревали 10 мин. при 60°C. После охлаждения добавляли субстрат и все пробы инкубировали при 37°C в течение одного часа. Все опыты ставили с активатором и без активатора (Mg^{++}).

Исследования показали, что активность щелочной фосфатазы печени севанской храмули повышается параллельно с повышением температуры инкубации: если при 17°C активность фермента колеблется в пределах 1,5—3,7 мг, то при 47°C она составляет 5—8 мг.

Исходя из данных таблицы, можно отметить, что щелочная фосфатаза печени севанских храмуль термостабильна. Возникает вопрос, какое физиологическое значение имеет термостабильность фермента, поскольку температура окружающей среды севанской храмули не превышает 18°C. С повышением температуры инкубации активность фермента повышается, но температурный коэффициент падает. Если при 17—27°C температурный коэффициент равен 1,7, то в инкубированных пробах при 37—47°C—1,1. Следовательно, щелочную фосфатазу печени севанской храмули нельзя рассматривать как термостабильный фермент, поскольку она с 27°C подвергается частичной денатурации.

Исследованиями также выяснилось, что печень севанской храмули обладает пирофосфатазной активностью. Активность пирофосфатазы без активатора (Mg^{++}) в опытах, инкубированных при 37°C, колеблется в пределах от 0,7—1 мг Р на 1 г свежей ткани. Под влиянием активатора активность фермента заметно повышается, составляя 3,3—4 мг Р.

Реагирование пирофосфатазы севанской храмули к температурной инактивации протекает следующим образом. При предварительном на-

гревании гомогената при 50, 60°C и инкубировании в течение одного часа при 37°C во всех опытах замечается резкое подавление активности фермента. Подобное снижение наблюдается в опытах с активатором и без активатора.

Таблица 2

Изменение активности неорганической пирофосфатазы печени севанской храмули, инкубация 60 мин.

Показатели	Инкубация без MgCl ₂						Сред. ариф.	%, соот.	Инкубация с MgCl ₂						Сред. ариф.	%, соот.
	1	2	3	4	5	6			1	2	3	4	5	6		
Норма 37°	1,0	0,9	0,7	0,9	1,0	0,88	100	4,0	3,4	2,8	3,5	3,9	3,5	100		
10 мин. 50°	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	0,40	45	1,9	1,7	1,3	1,7	2,0	1,7	43,2		
10 мин. 60°	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,16	18	0,8	0,7	0,5	0,7	0,4	0,6	17		

Как видно из табл. 2, в пробах с 10-минутным нагреванием при 50°C активность фермента снижается вдвое. Это говорит о том, что пирофосфатаза печени рыб термолabile.

Зависимость активности амилазы желчи севанской храмули от частичной термоденатурации. Для каждого опыта брали по 3—4 рыбы весом в 500 г. После декапитации быстро извлекали желчный пузырь. Полученную желчь разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:10. Разбавленную желчь разделили на четыре серии проб. Первая серия служила контролем, т. е. она не подвергалась частичной термоденатурации. Желчь второй, третьей и четвертой серий проб нагревали в течение 10 мин. соответственно при 40, 50 и 60°C. После охлаждения инкубировали при 26°C в течение 30 минут. Реакционная смесь состояла из 1 мл разбавленной желчи, 5 мл 1,2% раствора крахмала, 1 мл 0,5 М NaCl-активатора, pH=7,2.

Таблица 3

Активность амилазы желчи севанской храмули от частичной термоинактивации

Серия	Инкубация в течение 30 мин.	Инактивация 10 мин. при		
	26°	40°	50°	60°
1	40	15	10	2
2	36	15	4	0,0
3	38	7	3	0,0
4	32	7	2	0,2
5	38	12	3	0,2
Средн. ариф.	36	11	4	0,1

Результаты опытов, приведенных в табл. 3, показывают, что амилазная активность желчи при 26°C без частичной термоденатурации достаточно высокая. В то же время активность проб, подвергшихся нагреванию в течение 10 мин. при 40°C, была почти втрое, при 50°C почти в 6 раз и при 60°C примерно в 15 раз ниже контрольной. С повышением температуры активность фермента резко подавляется, т. е. фермент подвергается денатурации. Если полученные результаты сравнить с нашими,

Таблица 4

Влияние адреналина и серотонина на активность щелочной фосфатазы печени, кишечника и мозга севанской хангуды

Концентрация	Печень					Кишечник					Мозг						
	Адреналин	Серотонин	Адреналин	Серотонин	Контроль	Адреналин	Серотонин	Адреналин	Серотонин	Контроль	Адреналин	Серотонин	Адреналин	Серотонин	Контроль		
А д р е н а л и н																	
$7 \cdot 10^{-4}$	1,494	3,350	1,600	8,700	3,861	93	2,000	0,500	0,600	—	1,030	71	1,200	0,420	0,525	0,715	75
$5 \cdot 10^{-4}$	1,660	3,600	2,000	6,700	3,490	84	2,400	0,400	0,700	2,200	1,400	98	1,350	0,420	0,525	0,765	81
$3 \cdot 10^{-4}$	1,491	4,050	2,000	8,300	3,981	96	2,000	0,100	1,000	2,200	1,325	91	1,575	0,525	0,525	0,875	93
$1 \cdot 10^{-4}$	1,411	4,250	2,000	7,800	3,865	93	2,000	0,100	1,200	2,200	1,375	95	1,725	0,490	0,560	0,925	98
$0,5 \cdot 10^{-4}$	1,162	4,200	2,300	8,100	3,940	95	1,800	0,100	1,200	2,100	1,300	89	1,875	0,455	0,560	0,963	102
Норма	0,996	4,500	2,300	8,700	4,124	100	2,000	0,600	1,200	2,000	1,450	100	1,800	0,455	0,560	0,938	100
С е р о т о н и н																	
$5 \cdot 10^{-4}$	2,158	2,700	1,900	5,100	2,904	73	1,400	0,300	0,500	0,733	—	55	1,350	0,455	0,385	0,730	71
$3 \cdot 10^{-4}$	2,656	3,650	2,200	7,200	3,926	97	1,800	0,300	0,600	0,900	—	67	1,350	0,560	0,385	0,765	83
$1 \cdot 10^{-4}$	2,573	4,100	2,200	8,000	3,968	98	3,400	0,500	0,800	1,566	—	117	1,575	0,525	0,595	0,898	98
$0,5 \cdot 10^{-4}$	2,573	4,450	2,450	8,400	4,168	110	2,200	0,700	1,100	1,333	—	100	1,875	0,490	0,595	0,946	103
$0,1 \cdot 10^{-4}$	1,494	4,400	2,500	8,400	4,198	104	1,600	0,700	1,200	1,166	—	87	1,800	0,455	0,560	0,938	102
Норма	1,328	4,400	2,400	8,000	4,032	100	2,200	0,600	1,200	1,333	—	100	1,725	0,455	0,560	0,913	100

ранее полученными, данными [3], то не трудно заметить, что амилазы разных происхождений имеют неодинаковое отношение к температурной денатурации. Нами также было показано, что амилаза желчи овцы термолabileнее амилазы слюны человека, если амилаза слюны свою максимальную активность проявляла при 40, 50°C, то в тех же условиях амилаза желчи овцы теряла две трети части активности, а при 60° полностью подвергалась инактивации. Различие в амилазах у хладнокровных животных (рыб) более наглядно. По сравнению с амилазой слюны человека и овцы амилаза желчи рыб термостабильнее. Из приведенных данных следует, что существует видовое отличие амилаз, так как они имеют четкую избирательность по отношению к температурной денатурации.

Другая серия опытов была поставлена в печени, мозгу и тонких кишках. В указанных опытах определяли щелочную фосфатазу под влиянием адреналина и серотонина. Брели следующие концентрации адреналина $7 \cdot 10^{-4}$ — $0,5 \cdot 10^{-4}$ М, а серотонина — $5 \cdot 10^{-4}$ — 10^{-5} М. Исследования показали, что все взятые концентрации адреналина не только не активируют щелочную фосфатазу печени, мозга и тонких кишок, а, наоборот, имеют тенденцию к подавлению активности. Аналогичные данные были получены под влиянием серотонина. Большие концентрации серотонина $5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ М заметно понижают активность щелочной фосфатазы, а малые концентрации никакого влияния на активность фермента не оказывают.

Полученные данные приводят к мысли, что адреналин и серотонин не являются универсальными активаторами для щелочной фосфатазы одних и тех же органов разных видов животных: если у высокостоящих животных, как, например, кроликов, крыс и цыплят, имеют активизирующее действие относительно щелочной фосфатазы печени и почек, то у низкостоящих животных — лягушек, рыб проявляют подавляющее действие.

В ы в о д ы

1. С повышением температуры инкубации активность щелочной фосфатазы печени севанской храмули повышается, а температурный коэффициент, наоборот, снижается.
2. Пирофосфатаза печени севанской храмули является термолabileным ферментом.
3. Амилаза желчи проявляет максимальную активность при 26 С, с повышением температуры фермент при 40°, 50°C частично денатурируется, а при 60°C полностью инактивируется.
4. Малые концентрации адреналина и серотонина не влияют на активность щелочной фосфатазы, а большие концентрации имеют тенденцию к подавлению активности.

Գ. Ք. ԱԿՈՒՆՅ. Լ. Վ. ԵԱՐԿՈՅԱՆ

ՄԻ ՔԱՆԻ ԴՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՅՎԱՆԱ ԼՃԻ ԿՈՂԱԿ ՁԿԱՆ
ՅԵՐՄԵՆՏԱՏԻՎ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. ի. մ.

Սառածնասիրությունները կատարվել են Սեանո լճի կողակ ձկան վրա: Որոշվել է լյարդի հիմնային ֆոսֆատազայի, անօրգանական պիրոֆոսֆատազայի և չեզոչ ամիլազայի ակտիվության փոփոխության կախումը մասնակի ջերմային ինակտիվացիայից, ինչպես նաև ազդեցությանը ու սերոտոնինի ազդեցությունը կողակ ձկան լյարդի, աչիկների և ուղեղի հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության վրա:

Պարզվել է, որ կողակ ձկան լյարդի հիմնային ֆոսֆատազան ինկուբացիոն ջերմաստիճանի [17, 27, 37, 47] բարձրացման հետ միաժամանակ ջերմային պորմակիցը Q 10 նվազում է: Գործակիցը իր ամենամեծ արժեքն ստանում է 17—27-ի դեպքում:

Կողակ ձկան լյարդի անօրգանական պիրոֆոսֆատազայի ակտիվությունը խիստ ընկճվում է, երբ նախապես համոզենալով 10 րոպե 50-ում ենթարկվում է ջերմային մշակման, իսկ 60-ի զեպքում ֆերմենտը ենթարկվում է ինակտիվացիայի:

Նիսու ամիլազան մեծ ակտիվություն է ցուցաբերում ջերմային չմշակված նմուշներում (25°), իսկ երբ 10 րոպե տաքացվում է 40-ում և ապա ինկուբացվում 25°-ում, ֆերմենտը կորցնում է իր սկզբնական ակտիվության 2/3-ը:

Միաժամանակ պարզվել է, որ ազդեցությունից և սերոտոնինի տարրեր բանակները չեն ակտիվացնում կողակ ձկան լյարդի հիմնային ֆոսֆատազան, որը դրանով իսկ տարբերվում է մեր նախկին աշխատության մեջ [4] ուսումնասիրված ապիտակ առնետի ու ճուղարի հիմնային ֆոսֆատազաներից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. А д у н и Г. Т. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 15, 1, 41, 1962.
2. А д у н и Г. Т. Тр. I биох. конференции прибалтийских республик в Фелдруссеи 15—19 сентября, Тарту, 1960.
3. А д у н и Г. Т. и Н е р с е с я н Р. Р. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 14, 8, 17, 1961.
4. А д у н и Г. Т. и С а р к и с я н Л. В. Вопросы биохимии АН АрмССР, 3, 115, 1963.
5. W o d z a n s k y O. J. Biol. Chem., 101, 93, 1933.
6. L o w r y O. H. and L o p e z J. A. J. Biol. Chem., 143, 257, 1952.
7. S m i t h B. and R o e J. J. Biol. Chem., 179, 53, 1949.
8. H e p p e l L. A. Methods in Enzymology 2, 570, New York, 1955.