

Л. В. САРКИСЯН, Г. Т. АДУНЦ

АКТИВНОСТЬ ПИРОФОСФАТАЗЫ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

При аллоксановом диабете нарушается обмен углеводов, жиров и белков [2, 10]. В этом отношении привлекают внимание превращения фосфорных соединений, играющих важную роль в энергетическом обмене [3].

При аллоксановом диабете фосфорные соединения претерпевают ряд изменений. Работами Драбкина и Марша было установлено, что при выраженном аллоксановом диабете активность фосфомоноэстераз (щелочная и кислая) в печени крыс резко увеличивается [5, 8].

С этой точки зрения представляло определенный интерес изучить изменение активности пирофосфатазы некоторых органов белых крыс при аллоксановом диабете.

Методика. Животных одного пола и одинакового веса (100—120 г) делили на две группы: первая служила контрольной группой, у второй группы вызывали аллоксановый диабет интраперитонеальным введением 20 мг аллоксана (100 г живого веса). Развитие диабета контролировали ежедневным определением содержания глюкозы в моче по Фелингу и ацетона—по Лестраду [1, 2, 4]. На опыт брали только тех животных, у которых отмечалось четкое проявление всех характерных для острого диабета симптомов: атоническое угнетение состояния, гипергликемия (300—500 мг %), глюкозурия и ацетонурия.

После декапитации быстро извлекали исследуемый орган (печень, почки, слизистая оболочка тонких кишок), гомогенизировали с 0,02 М медиановым буфером в холодных условиях микроизмельчителем тканей. Каждый мл гомогената соответствовал 40 мг свежей ткани. Активность пирофосфатазы определяли методом Геппеля [6]. Реакционная смесь состояла из: 1 мл субстрата 0,01 М пирофосфата натрия, 4 мл медианового буфера pH 7,2, активатора— Mg^{++} в концентрациях 10^{-2} — 10^{-3} М и 1 мл гомогената. Инкубацию проводили в течение часа при 37°C. После инкубации в безбелковом фильтрате определяли неорганический фосфор по методу Лоури и Лопеса [7]. Активность фермента выражали в мг отщепившегося фосфора на грамм свежей ткани за час инкубации. Колориметрацию проводили на ФЭК-М красным фильтром (длина волны 600—650 мμ).

Полученные результаты и их обсуждение. Приведенные данные (табл. 1) показывают, что в контрольных опытах активность пирофос-

Таблица 1

Активность пирофосфатазы печени белых крыс при аллоксановом диабете

Контроль			Аллоксановый диабет		
без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М	без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М
1,250	5,500	68,750	7,750	9,500	70,000
2,500	3,750	80,000	9,250	11,250	80,000
2,750	4,500	82,500	5,250	8,750	72,500
4,500	4,750	62,500	7,000	7,750	78,750
3,750	3,750	58,750	7,500	8,750	67,500
2,750	4,250	71,250	9,750	11,250	73,750
1,500	4,750	61,250	5,000	8,250	65,500
m 2,700	4,460	69,280	7,360	9,360	72,500
$\pm m \pm 0,43$	$\pm 0,19$	$\pm 3,53$	$\pm 0,67$	$\pm 0,52$	$\pm 2,06$

фатазы печени крыс составляет 2,700 мг Р/г свежей ткани. При добавлении Mg^{++} активность фермента повышается параллельно с увеличением его концентрации (10^{-3} , 10^{-2} М). Если активность фермента без активатора принять за 100%, то при добавлении Mg^{++} в концентрации 10^{-3} М она составляет 162%, при 10^{-2} М—2695%. При аллоксановом диабете активность пирофосфатазы печени белых крыс увеличивается почти в 3 раза по сравнению с контрольными опытами без активатора. При добавлении вышеуказанных концентраций Mg^{++} активность фермента также увеличивается. Как видно из таблицы активирующее действие Mg^{++} неодинаково проявляется у контрольных и диабетических крыс. Mg^{++} в концентрации 10^{-2} М увеличивает активность пирофосфатазы печени контрольных животных в 26 раз, а у крыс, страдающих диабетом, Mg^{++} повышает активность фермента лишь в 7 раз по сравнению с опытами без активатора.

Таблица 2

Активность пирофосфатазы почек белых крыс при аллоксановом диабете

Контроль			Аллоксановый диабет		
без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М	без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М
7,500	8,000	56,250	4,250	5,000	56,250
9,500	11,000	60,250	6,250	6,500	68,750
7,750	7,500	65,000	4,250	5,000	52,500
7,250	9,000	51,250	6,500	6,000	65,750
9,000	6,750	53,750	4,250	6,000	63,750
6,000	6,500	44,750	5,500	6,250	55,000
6,500	7,500	48,750	7,000	8,250	50,500
m 7,570	8,000	54,280	5,420	6,000	58,860
$\pm m \pm 0,47$	$\pm 0,58$	$\pm 2,7$	$\pm 0,44$	$\pm 0,41$	$\pm 2,7$

Почки белых крыс (без активатора) обладают более высокой пирофосфатазной активностью по сравнению с печенью (7,43 мг Р/г свежей ткани). Mg^{++} в концентрации 10^{-3} М существенного влияния не оказывает на активность фермента, а 10^{-2} М его концентрации увеличивает активность фермента около 8 раз. При аллоксановом диабете активность фермента без активатора не только не увеличивается, а, наоборот, отмечается тенденция к снижению. Ионы Mg^{++} повышают пирофосфатазную активность при концентрации 10^{-2} М, а при 10^{-3} М концентрация почти не влияет на активность фермента.

Таблица 3

Активность пирофосфатазы слизистой оболочки тонких кишок белых крыс
при аллоксановом диабете

Контроль			Аллоксановый диабет		
без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М	без Mg^{++}	Mg^{++} 10^{-3} М	Mg^{++} 10^{-2} М
12,750	15,500	56,710	15,500	17,000	60,000
14,500	16,000	46,250	17,500	21,500	50,000
14,250	15,250	58,750	15,000	20,000	65,000
14,000	18,000	65,000	19,500	16,500	57,500
11,500	15,000	60,000	21,500	22,000	62,500
15,250	16,750	46,250	18,500	23,000	63,750
14,500	15,750	61,000	15,250	20,750	68,000
13,800	16,320	56,710	17,530	20,100	61,000
$\pm 0,48$	$\pm 0,408$	$\pm 2,76$	$\pm 0,9$	$\pm 0,93$	$\pm 2,2$

В табл. 3 приведены данные, касающиеся пирофосфатазной активности слизистой оболочки тонких кишок белых крыс. Активность пирофосфатазы слизистой оболочки тонких кишок почти вдвое превалирует над активностью почечной пирофосфатазы (13,800 мг Р/г свежей ткани). Незначительное увеличение, наблюдаемое при концентрации 10^{-3} М Mg^{++} , переходит в резкое увеличение при 10^{-2} М концентрации. При аллоксановом диабете активность фермента увеличивается на 27% по сравнению с контрольными опытами без активатора. Такая же закономерность наблюдается при действии ионов Mg^{++} в концентрациях 10^{-3} , 10^{-2} М, т. е. с увеличением концентрации активатора активность фермента повышается.

Однако остается неясным механизм активирования пирофосфатазы печени белых крыс при аллоксановом диабете. С этой целью нами были поставлены опыты на срезах и гомогенатах печени.

Срезы [9] из печени крысы помещали в среду аллоксанового раствора, конечная концентрация которого соответствовала концентрации введенного аллоксана. Параллельно ставили контрольные опыты в тех же условиях в физрастворе (по 500 мг). Срезы оставляли при температуре 22° в течение 30 мин, после чего ткани гомогенизировали и определяли

пирофосфатазную активность. В другом случае аллоксан добавляли непосредственно к гомогенату.

В этой серии опытов было установлено, что аллоксан *in vitro* не оказывает какого-либо действия на пирофосфатазную активность печени белых крыс. Таким образом, исключается возможность непосредственного влияния аллоксана на пирофосфатазную активность печени.

Таблица 4

Действие аллоксана на активность пирофосфатазы печени белых крыс

С р е з ы						Гомогенат	
В физрастворе						без аллокса- на	с аллок- саном
контроль	Mg ⁺⁺ 10 ⁻³ М	Mg ⁺⁺ 10 ⁻² М	контроль	Mg ⁺⁺ 10 ⁻³ М	Mg ⁺⁺ 10 ⁻² М		
1,250	2,500	66,250	2,000	2,750	66,000	2,000	2,250
1,500	2,750	69,500	1,500	2,500	68,750	2,500	2,000
2,500	3,350	65,500	2,250	3,750	66,000	2,500	2,000
2,000	3,750	70,000	2,500	3,750	70,000	2,000	2,500
2,25,	2,500	66,000	2,250	2,500	66,000	1,500	1,750
1,900	3,050	67,450	2,100	2,750	67,350	2,100	2,100
±0,23	±0,28	±0,94	±0,16	±0,28	±0,85	±0,18	±0,1

Аллоксан повреждает специфически β-клетки островков Лангерганса, что наряду с другими расстройствами приводит также к нарушению обмена липидов, при этом в организме наблюдается накопление значительного количества кетонных тел, особенно ацетона, действие которого интересно было изучить на пирофосфатазную активность.

Было установлено, что ацетон в концентрации 10⁻³ М резко понижает активность фермента, а в концентрации 5 · 10⁻⁴ М не оказывает влияния на него. Однако концентрация ацетона 10⁻³ М не является физиологической, кроме того, при добавлении ацетона к гомогенату отмечается частичное осаждение белков. По-видимому, инактивирующее действие 10⁻³ М ацетона скорее всего обуславливается денатурирующими явлениями. Следовательно можно предположить, что накопленный ацетон при аллоксановом диабете в крови не может оказать определенных сдвигов в активности пирофосфатазы.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что при аллоксановом диабете активность пирофосфатазы претерпевает неодинаковое изменение в различных органах белых крыс: в печени активность фермента резко повышается по сравнению с нормой, в слизистой оболочке тонких кишок замечается некоторое увеличение, а в почках, наоборот, имеет тенденцию к понижению.

Неодинаковое активирование фермента под действием ионов магния наблюдается в различных органах контрольных и диабетических крыс: в печени и слизистой оболочке тонких кишок контрольных животных активация при 10⁻² М концентрации гораздо выше, чем у животных,

Т а б л и ц а 5
Действие ацетона на активность пи-
рофосфатазы печени белых крыс

Контроль	Ацетон 10^{-3} М	Ацетон $5 \cdot 10^{-4}$
3,000	1,500	3,500
4,250	1,250	4,000
4,000	1,000	4,250
3,750	1,500	3,250
3,000	1,000	3,000
3,600	1,250	3,600
$\pm 0,25$	$\pm 0,027$	$\pm 0,23$

страдающих аллоксановым диабетом. Однако эта закономерность не наблюдается в почках белых крыс.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 19.XI 1969 г.

Լ. Վ. ՍԱՐԿՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ՊԻՐՈՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԼՈՔՍԱՆԱՅԻՆ ԴԻԱԲԵՏԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Փորձերը իրականացվել են սպիտակ առնետների լյարդի, երիկամների և բարակ աղիների լորձաթաղանթների վրա ալոքսանային դիաբետի ժամանակ: Պարզվել է, որ ալոքսանային դիաբետի ժամանակ պիրոֆոսֆատազային ակտիվությունը լյարդում բարձրանում է 170%-ով, բարակ աղիների լորձաթաղանթում 12,7%-ով, իսկ երիկամներում, ընդհակառակը, նկատվում է ֆերմենտի ակտիվության իջեցում:

Պիրոֆոսֆատազային ակտիվության աննշան բարձրացում նկատվում է ինչպես նորմայում, այնպես էլ ալոքսանային դիաբետով հիվանդ առնետների մոտ, երբ ավելացվում է 10^{-3} М մագնեզիում, իսկ մագնեզիումի 10^{-2} М կոնցենտրացիան խիստ ակտիվացնում է ֆերմենտին:

Ալոքսանը in vitro լյարդի կտրվածքներում պիրոֆոսֆատազային ակտիվության վրա ոչ մի ազդեցություն չի գործում: Նույնպիսի պատկեր է նկատվում նաև այն դեպքում, երբ ազդում ենք ացետոնի $5 \cdot 10^{-4}$ М կոնցենտրացիայով, այն դեպքում, երբ վերջինիս 10^{-3} М կոնցենտրացիան ուժեղ կերպով ընկճում է ֆերմենտի ակտիվությանը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гулевич В. Анализ мочи, Медгиз, стр. 143, 1945.
2. Егян В. Б. и Акопян Г. Е. Вопросы биохимии мозга, III, Ереван, 1967.
3. Лисовская Н. П., Ливанова Н. Б. Фосфопротеины, Изд. АН СССР, М., 1960.
4. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии, Гос. Изд. «Медицина и физкультура», София, 1963.

5. Drabkin D. L., Marsh J. B. J. Biol. Chem. 168, 2, 777, 1947.
6. Hoppel L. A. Methods in Enzymology, 2, 570, N. Y., 1955.
7. Lowry O. H. and Lopez J. A. J. Biol. Chem., 143, 257, 1952.
8. Marsh J. B. and Drabkin D. L. J. Biol. Chem., 168, 1, 61, 1947.
9. McIlwain H. and Tresire M. A. Biochem J., 63, 250, 1956.
10. Mclean P. and Novello F. Biochem. J., 94, 410, 1965.