

Г. Т. АДУНЦ, Л. В. САРКИСЯН

УЧАСТИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Приведены возможные механизмы регуляции активности щелочной фосфатазы почек и слизистой оболочки тонких кишок белых крыс адреналином и аскорбиновой кислотой. Без воздействия указанными соединениями ферментативная активность гомогенатов тканей выявляется не полностью. По-видимому, под действием адреналина и аскорбиновой кислоты фермент переходит в активную форму. Часть его, возможно, находится в неактивной форме, так как цинк в его активном центре связан с SH-группами. При воздействии на фермент тиоловых ядов из активного центра удаляются SH-группы, и, таким образом, активность щелочной фосфатазы удваивается, а иногда и утраивается.

Полученные данные дают нам основание предположить, что в регулировании активности щелочной фосфатазы важную роль играют адреналин и аскорбиновая кислота.

Характерное для обмена веществ сочетание гибкости и устойчивости реализуется на уровне клетки тонкой координацией скоростей многочисленных ферментативных реакций. Этому способствует то обстоятельство, что многие ферменты не проявляют в обычных условиях всей своей каталитической мощи [6, 7] и что активность фермента способна колебаться в широких пределах в зависимости от функционального состояния организма.

Так, из работ Дабкина и Марша [12] известно, что при выраженном аллоксановом диабете активность щелочной фосфатазы в несколько раз увеличивается. Авторы этот эффект объясняют доминированием адреналовой системы над инсулярной. Изучением прямого действия адреналина на щелочную фосфатазу занимался Андерсен [10]. Он выяснил, что при добавлении в среду адреналина в концентрации 0,2—0,5 М резко подавляется активность этого фермента.

Нашими работами было показано, что большие дозы адреналина, в количестве 0,2—0,5 М, действительно подавляют активность фермента, тогда как сравнительно малые его дозы ($3 \cdot 10^{-4}$ М), наоборот, резко повышают ее [3, 4]. Однако механизм действия адреналина на активность щелочной фосфатазы остается все еще не раскрытым. Поэтому в нашу задачу входило исследовать влияние различных концентраций адреналина, аскорбиновой кислоты и иониз магния на активность щелочной фосфатазы почек белых крыс; влияние цистеина и цинка на актив-

ность щелочной фосфатазы, влияние тиоловых реагентов на активность щелочной фосфатазы.

Перечисленные реагенты избраны нами для выяснения механизма активации фермента адреналином.

Методика. Опыты ставились на почках и слизистой оболочке тонких кишок белых крыс весом 80—100 г. Активность щелочной фосфатазы определялась в гомогенатах тканей по методике, описанной в наших предыдущих работах [1, 2]. На фоне контрольных опытов изучалось влияние адреналина, аскорбиновой кислоты, цинка, меди, цистеина, цистина, пара-хлормеркурибензоата, монохлоруксусной кислоты и магния на активность щелочной фосфатазы.

Активность фермента рассчитывали по количеству отщепившегося от β -глицерофосфата неорганического фосфора в мг на 1 г сырого веса ткани в течение 15- или 30-минутной инкубации.

Экспериментальная часть. На рис. 1 приводятся данные, касающиеся совместного и раздельного влияния адреналина, аскорбиновой кислоты и магния на активность щелочной фосфатазы почек белых

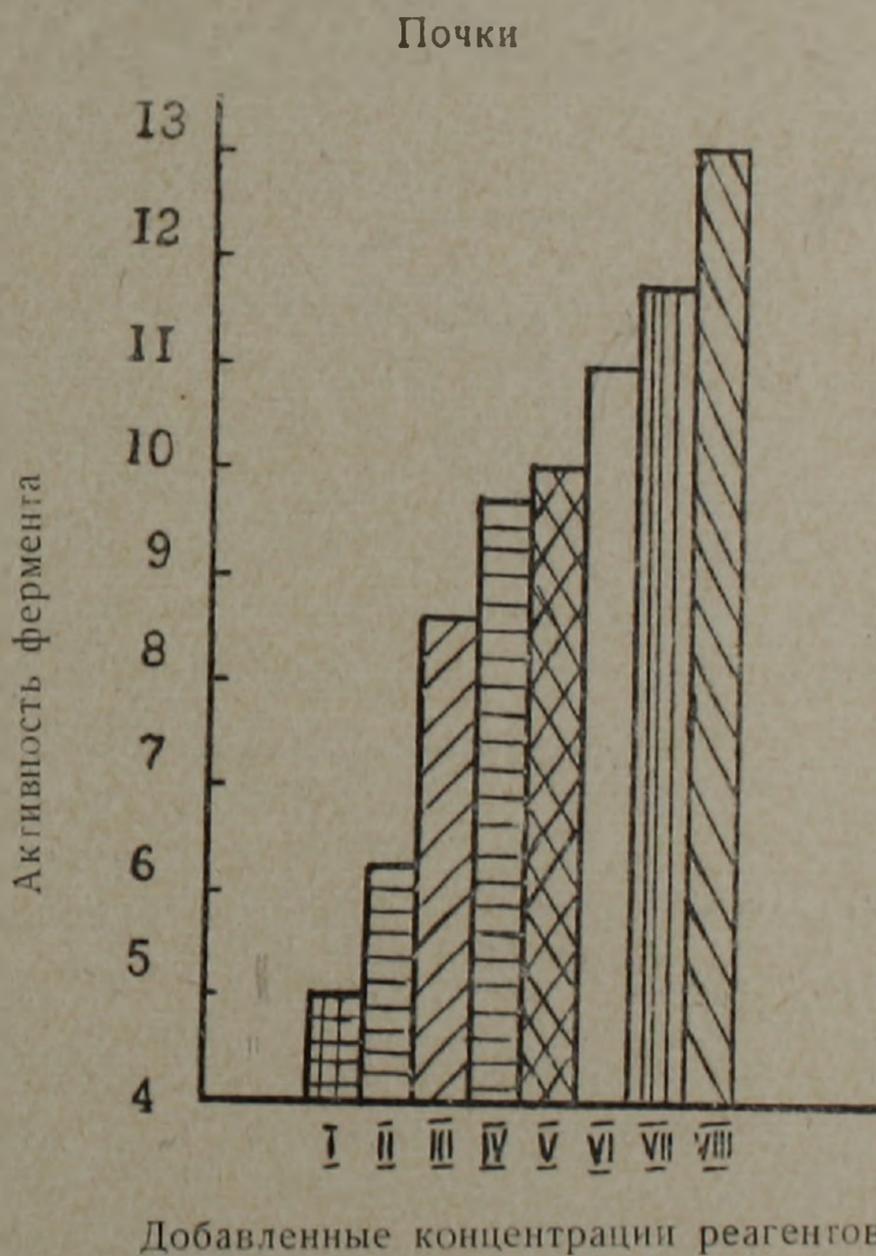


Рис. 1. Норма, II— MgCl_2 $5 \cdot 10^{-3}$ М, III—аскорбиновая кислота + MgCl_2 , IV—аскорбиновая кислота $3 \cdot 10^{-4}$ М, V—аскорбиновая кислота + адреналин, VI—аскорбиновая к-та + адреналин + MgCl_2 , VII—адреналин $3 \cdot 10^{-4}$ М, VIII—адреналин + MgCl_2 .

крыс. Эти данные представляют собой средние величины десяти опытов, где активность фермента в норме колеблется в пределах 3,5—7,25 мг Р/г ткани, средней величиной является 5,3 мг Р/г ткани. Под влиянием адреналина активность фермента достигает 11,45 мг, что вдвое превы-

шает норму. Под влиянием ионов магния она увеличивается по сравнению с нормой лишь на 20—25%. Совместное воздействие магния и адреналина превосходит сумму эффектов, вызываемых адреналином и магнием в отдельности, достигая 13,75 мг. Этот факт, по-видимому, отражает различный характер активации ионами магния и адреналином. Аскорбиновая кислота повышает активность щелочной фосфатазы на 80%. Подобные данные получены и Китаемой [13]. Одновременное использование двух активаторов (аскорбиновая кислота, адреналин) повышает активность фермента также почти в два раза. При одновременном добавлении к реакционной смеси адреналина, аскорбиновой кислоты и магния наблюдается повышение ферментативной активности также в два раза. Наилучший активирующий эффект оказывает комбинация адреналина и магния, самый же слабый эффект получен при действии магния. Промежуточное положение по силе воздействия занимает аскорбиновая кислота.

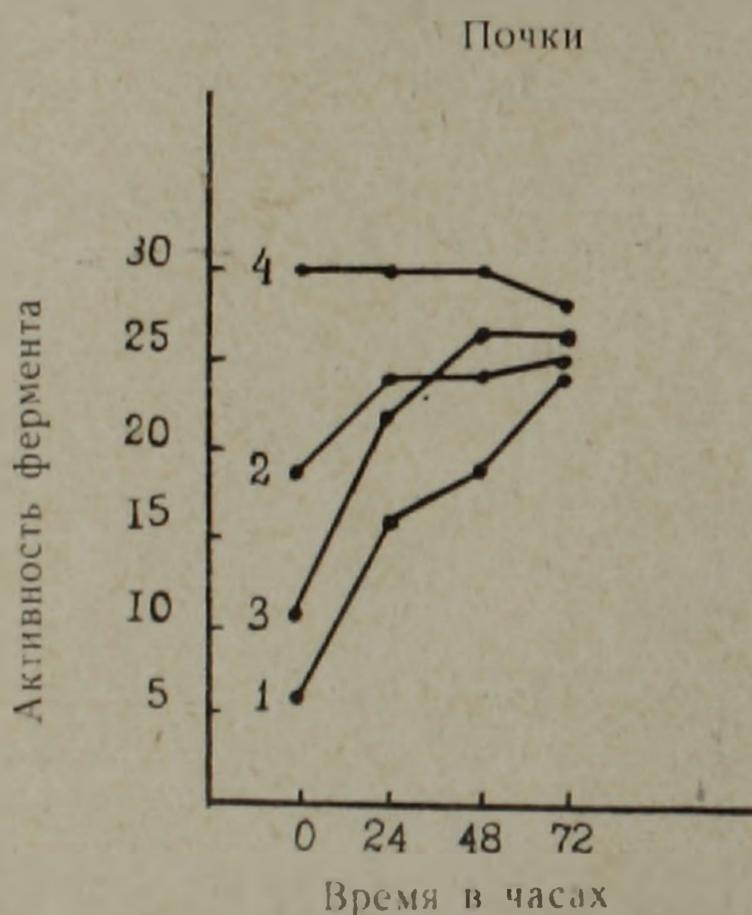


Рис. 2. I—Норма, II—Адреналин $3 \cdot 10^{-4}$ М, III— $MgCl_2$ $5 \cdot 10^{-3}$ М, IV—Адреналин + $MgCl_2$.

В следующей серии наших опытов (рис. 2) изучалась активность щелочной фосфатазы в условиях добавления адреналина к свежему и хранившемуся (24, 48, 72 час.) гомогенату.

Предварительные опыты показали, что аскорбиновая кислота и адреналин значительно отличаются по силе своего воздействия на активность щелочной фосфатазы свежего и хранившегося в течение 2—3 час. на холоду ($2^{\circ}C$) гомогената.

Из литературных данных известно, что целостные клетки и свежий гомогенат [11] не проявляют ферментативную активность в полную мощь. Если гомогенат хранился (24 час.) при температуре в пределах 2° , активность щелочной фосфатазы в нем увеличивалась в 2—3 раза [2].

Нами исследовалось влияние адреналина на активность фермента на фоне старения гомогената. Если в свежем гомогенате почек крыс ад-

ренилин активизирует щелочную фосфатазу в 2—3 раза, то со старением его это влияние ослабевает, сводясь к нулю спустя 48—72 часа. Таким образом, механизм активирующего действия адреналина на щелочную фосфатазу кажется загадочным. Непонятно, каким образом адреналин активизирует щелочную фосфатазу свежих гомогенатов, не влияя в то же время на активность фермента в состарившемся гомогенате.

Анализируя данные, приведенные на рис. 2, в котором суммированы результаты 6 опытов, нетрудно заметить, что в свежем гомогенате проявляется лишь 1/5 часть общей ферментативной активности, а в хранившемся в течение 72 час. гомогенате активность фермента проявляется в полной мере. На этом фоне адреналин не оказывает активирующего воздействия на фермент. Отсюда следует, что адреналин действует на ту часть его, которая находится в неактивном состоянии. Он способствует переходу неактивных молекул фермента в активные формы. Этот процесс может протекать и без наличия какого-либо реагента, но требует гораздо большего времени. Так, при хранении гомогената в стерильных условиях на холоду ($\pm 2^\circ$) происходит медленная активация фермента. В результате сопутствующих окислительно-восстановительных процессов высвобождается «замаскированная» (неактивная) часть молекул его.

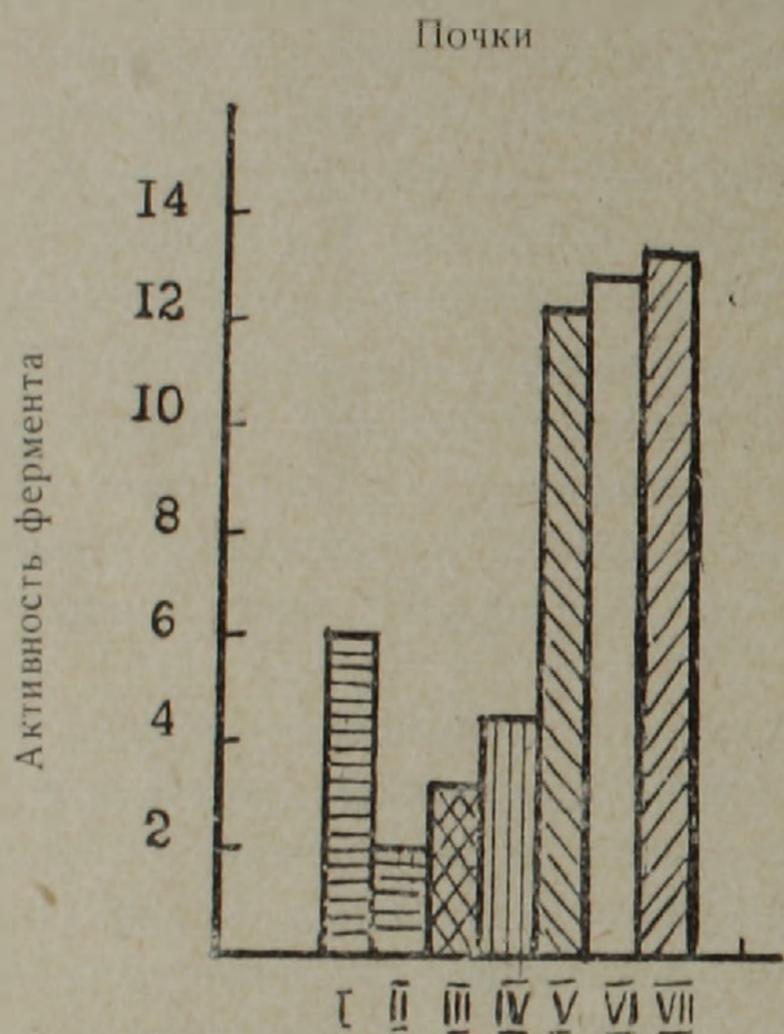
Нам кажется неубедительным объяснение повышения активности фермента в хранящемся гомогенате простой экстракцией щелочной фосфатазы из структурных клеточных элементов в окружающую среду. По-видимому, фермент блокируется низкомолекулярными соединениями. Однако остается невыясненным, какие именно соединения, связывающие активный центр фермента, столь быстро высвобождаются под действием катехоламинов. Возможно, что этим оксидо-редуцирующим веществом является цистеин.

Согласно данным литературы, щелочная фосфатаза относится к тиоловым ферментам [8, 9, 16]. Известно также, что между цинком и SH-группами существует высокое сродство, осуществляемое координационной связью [5, 12]. Это послужило основанием для изучения действия различных концентраций цинка и цистеина на активность щелочной фосфатазы.

Постановка вопроса заключалась в том, что если щелочная фосфатаза действительно является тиоловым ферментом, то соответствующие концентрации цистеина должны были повысить в той или иной мере активность этого фермента. Далее, если цинк является составной частью активного центра фермента, то совместное действие его и цистеина на увеличение активности щелочной фосфатазы должно было быть очевидным. Этим вопросам была посвящена следующая серия опытов. Исследовалась активность щелочной фосфатазы почек белых крыс в норме, которая составляла в среднем 6,06 мг для пяти опытов, и при добавлении различных концентраций реагентов (рис. 3).

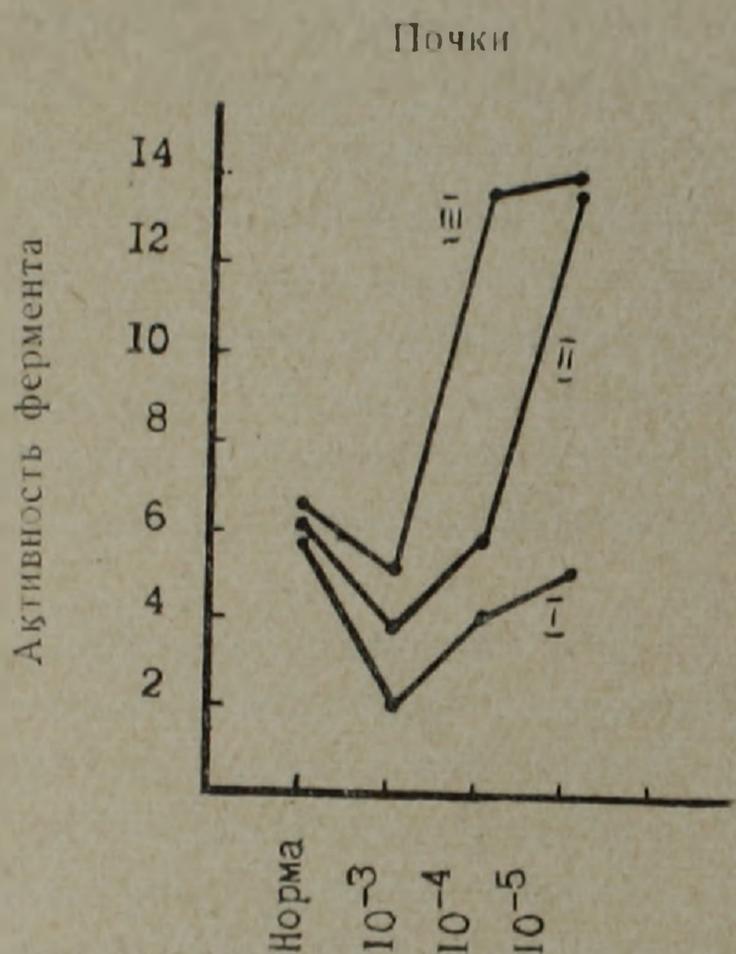
Установлено, что цинк в концентрации 10^{-5} М почти в два раза подавляет ферментативную активность, а при 10^{-4} М она остается почти

неизменной. С понижением концентрации в реакционной смеси активность фермента значительно повышается, в частности при 10^{-5} М— вдвое. Бимодальный характер действия цинка объясняется тем, что в высоких концентрациях (10^{-3} М), соединяясь с белком-ферментом, он образует хелаты, по-видимому, снижающие его растворимость и приводящие к падению его активности. Небольшие же концентрации этого катиона восполняют потребность в нем активного центра фермента и в конечном итоге повышают активность щелочной фосфатазы.



Добавленные концентрации реагентов
Рис. 3.

Рис. 3. I—Норма, II—Цистеин 10^{-3} М, III—Цинк 10^{-3} М, IV—Цистеин 10^{-5} М, V—Цистеин 10^{-5} М, VI—Цинк 10^{-5} М, VII—Цистеин 10^{-3} + Цинк 10^{-5} М.



Концентрация в молях
Рис. 4.

Рис. 4. I—Цистеин, II—Цинк, III—Цистеин+Цинк.

Цистеин во всех взятых концентрациях, от 10^{-3} до 10^{-5} М, подавляет активность фермента. При этом с повышением концентрации его соответственно увеличивается и ингибирующий эффект его. Концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М не оказывают никакого влияния на активность щелочной фосфатазы.

Как указывалось выше, щелочная фосфатаза рассматривается как тиоловый фермент [9]. Поэтому надо полагать, что хотя бы одна из использованных концентраций цистеина должна была повысить активность этого фермента. Выяснилось, что цистеин не только не активизирует, но и, наоборот, резко подавляет ферментативную активность. Следовательно, можно усомниться в том, что щелочная фосфатаза является классическим тиоловым ферментом.

Цинк и цистеин в концентрациях 10^{-3} М, каждый в отдельности, понижают активность почечной фосфатазы в два раза (рис. 4). В то же

время при одновременном воздействии обоих реагентов в указанной концентрации падение активности бывает гораздо меньшим (менее, чем действие любого отдельно взятого реагента). При одновременном воздействии их в концентрации 10^{-4} М наблюдалось увеличение активности фермента в два раза. Такой же эффект отмечается при совместном действии тех же реагентов в концентрации 10^{-5} М. По-видимому, при одновременном использовании цинка и цистеина в концентрации 10^{-4} М цинк связывается в своей значительной части с цистеином, в результате чего концентрация его снижается от тормозящей до активирующей зоны. Одновременно падение количества цистеина также снижает его ингибирующий эффект. Можно заключить, что между цинком и цистеином имеется определенное сродство. Не исключено, что благодаря такому взаимодействию между цистеином и цинком осуществляется регуляция ферментативной активности как *in vivo*, так и *in vitro*.



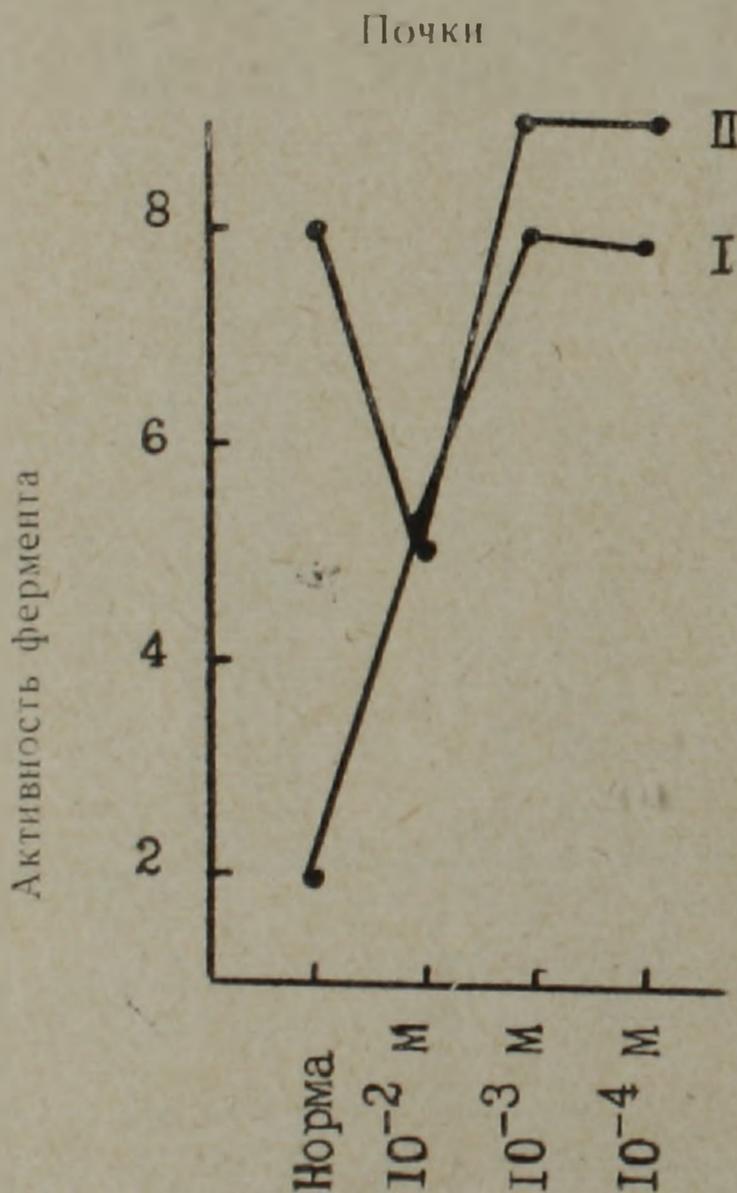
Рис. 5. I—Норма, II—Цистин 10^{-3} М, III—Моноiodуксусная кислота 10^{-2} М, IV—Пара-хлормеркурибензоат 10^{-3} М

В следующей серии опытов мы изучали изменение активности щелочной фосфатазы почек под влиянием тиоловых реагентов. К инкубационной среде добавлялись нейтрализованная моноiodуксусная кислота в концентрации 10^{-2} , 10^{-3} М и п-ХМБ в концентрации 10^{-3} М, приготовленный на миналовом буфере pH 9,6. Кроме тиоловых реагентов, использовался также цистин в концентрации 10^{-3} М. Данные этой серии опытов приведены на рис. 5, из которого следует, что активность фермента в норме при 15-минутной инкубации колеблется в пределах 1,23—3,0 мг Р/г свежей ткани (среднее—2,33 мг). В присутствии 10^{-3} М

п-ХМБ она повышается в 5,5 раза, а 10^{-2} М моноiodоксусной кислоты— в 5 раз.

Приведенные данные говорят о том, что щелочная фосфатаза, по-видимому, содержит SH-группы, но они, блокируя Zn^{++} активного центра фермента, тормозят его активность. Цистин может вступать во взаимодействие с SH-группами [15], отрывая их от молекулы фермента (обменная реакция) и тем самым повышая его активность.

Интересны результаты, полученные при взаимодействии тиоловых реагентов с щелочной фосфатазой гомогенатов, хранившихся в течение 24 час. в холодных условиях. Как видно из рис. 5, активность фермента в хранившемся гомогенате в 5 раз превышает ферментативную активность свежего гомогената. Цистин, моноiodоксусная кислота и п-ХМБ почти не оказывают влияния на ферментативную активность хранившегося гомогената.



Добавленные концентрации меди

Рис. 6. I—Свежий гомогенат, II—Хранившийся гомогенат.

Из этих данных становится ясным, что, действительно, п-ХМБ и моноiodоксусная кислота блокируют SH-группы, связанные с Zn^{++} активного центра фермента в свежем гомогенате, повышая активность щелочной фосфатазы. В хранившемся 24 час. гомогенате в присутствии указанных реагентов активации фермента не происходит, так как SH-группы, связанные с цинком, успевают подвергнуться «аутоокислению» [8], что приводит к полному высвобождению фермента. В результате этого происходит повышение суммарной активности фермента. На этом

фоне тиоловые реагенты, естественно, уже не могут оказать какого-либо существенного воздействия на ферментативную активность.

Из литературы известно, что Cu^+ , Cu^{++} имеют высокое сродство с SH-группами [14]. Между ними происходит взаимодействие, вследствие которого SH-группы окисляются, и фермент освобождается от присоединенных координационными связями SH-групп.

В этом аспекте мы попытались выявить взаимосвязь между концентрацией ионов меди и активностью фермента, определить влияние ионов меди на щелочную фосфатазу в свежем и хранившемся гомогенатах.

Концентрация меди в реакционной среде составляла 10^{-2} — 10^{-4} М. Опыты проводились на свежих и хранившихся в течение 24 час. гомогенатах почек белых крыс, подвергавшихся инкубированию в течение 15 мин при температуре 37°C . Результаты опытов приведены на рис. 6.

Ионы меди в различных концентрациях по-разному влияли на активность щелочной фосфатазы в свежих и хранившихся гомогенатах. В свежем гомогенате медь в концентрации 10^{-2} М повышает активность фермента в 2,5 раза, а в концентрации 10^{-3} и 10^{-4} М — в 4 раза, в хранившемся же 24 час. гомогенате ионы меди в концентрации 10^{-2} М подавляют ее на 60%, при концентрациях 10^{-3} , 10^{-4} М изменений в этом отношении не происходит.

В следующей серии опытов подавлялась активность щелочной фосфатазы почек крыс цистеином, и затем эффект последнего снимался ионами меди (рис. 7). Выяснилось, что цистеин (10^{-3} М) подавляет актив-

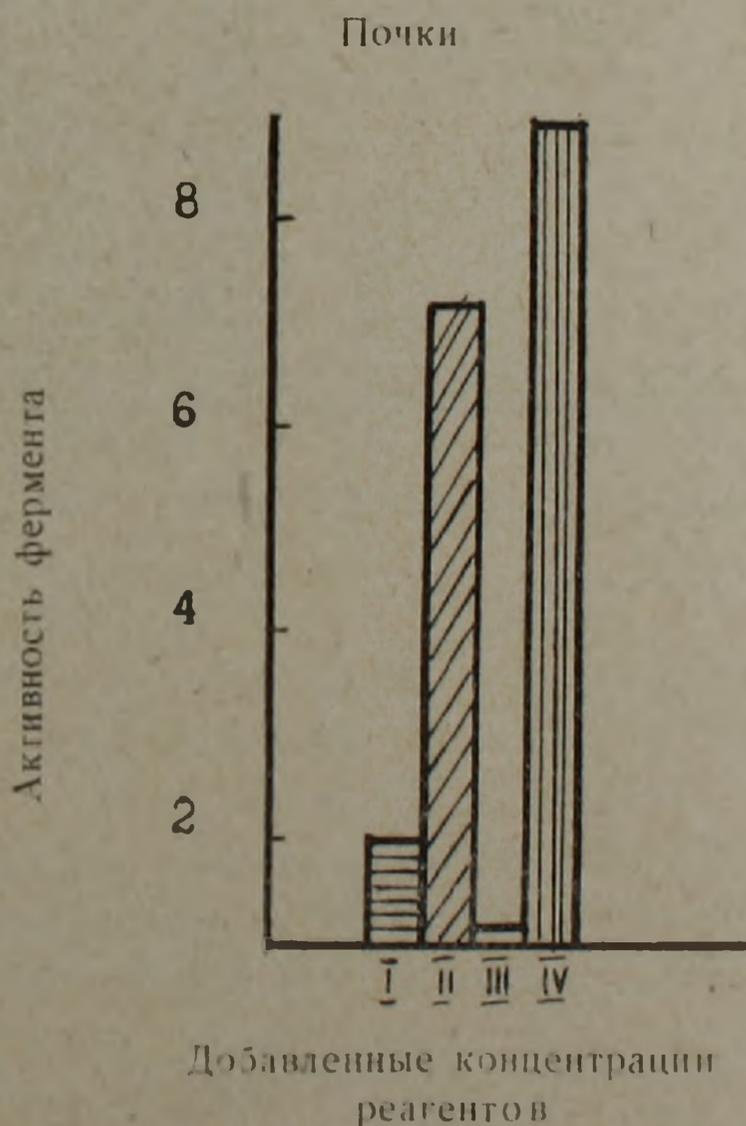


Рис. 7. I—Норма, II— CuSO_4 10^{-3} М, III—Цистеин 10^{-3} М, IV—Цистеин 10^{-3} + CuSO_4 10^{-3} М.

ность фермента более чем в два раза, а Cu^{++} в концентрации 10^{-3} М активизирует его в 3,5 раза. Совместное действие указанных концентраций

цистеина и меди повышает активность щелочной фосфатазы в 4,5 раза, что примерно соответствует эффекту только ионов меди. Этот факт говорит о том, что медь полностью снимает ингибирующее действие цистеина. Следовательно, механизм активации фермента ионами меди действительно протекает путем связывания SH-групп.

Ранние наши исследования выявили заметное повышение активности щелочной фосфатазы при пятидесятиградусном нагревании почечных гомогенатов крыс в течение 10 мин. Этот эффект в свое время не был объяснен достаточно убедительно [1]. Однако в последующих экспериментах этот вопрос получил соответствующую интерпретацию. нас заинтересовала реакция фермента из нагретого гомогената на добавление тиоловых реагентов (п-ХМБ, моноiodоксусная кислота), а также цистеина, цинка, цистина в аспекте ее сравнения с ненагретым гомогенатом. Как видно из рис. 8, при 10-минутном нагревании почечного гомоге-



Рис. 8. I—Норма, II—Цистеин 10^{-3} М, III—Моноiodоксусная к-та 10^{-2} М, IV—п-ХМБ 10^{-3} М, V—Цистин 10^{-2} М, VI—Цинк 10^{-5} М, VII—Цинк 10^{-4} М.

ната белых крыс при 50° активность фермента значительно повышается. При добавлении к нему цистеина (10^{-3} М) она заметно понижается и в нагретом и в контрольном вариантах. Моноiodоксусная кислота (10^{-2} М) активирует оба гомогената, однако ненагретый в большей степени. п-ХМБ (10^{-3} М) и цистин (10^{-2} М) повышают активность фермента в обоих гомогенатах равнозначно. Однако повышение ферментативной активности также значительно в ненагретом гомогенате, чем в нагретом. Цинк в концентрации 10^{-5} М понижает активность в термообработанном гомогенате и несколько повышает в гомогенате без

термообработки. Повышение активности щелочной фосфатазы в результате термообработки гомогенатов почек крыс (50°C, 10 мин) как и в случае хранения его, мы склонны объяснить окислением SH-групп, связывающих в обычных условиях активный центр фермента.

Известно, что эффективным тиоловым реагентом также является кадмий. В последней серии опытов мы изучали влияние разных концентраций его (10^{-2} — 10^{-6} М) на активность щелочной фосфатазы почек и слизистой оболочки тонких кишок белых крыс (рис. 9). Приведен-

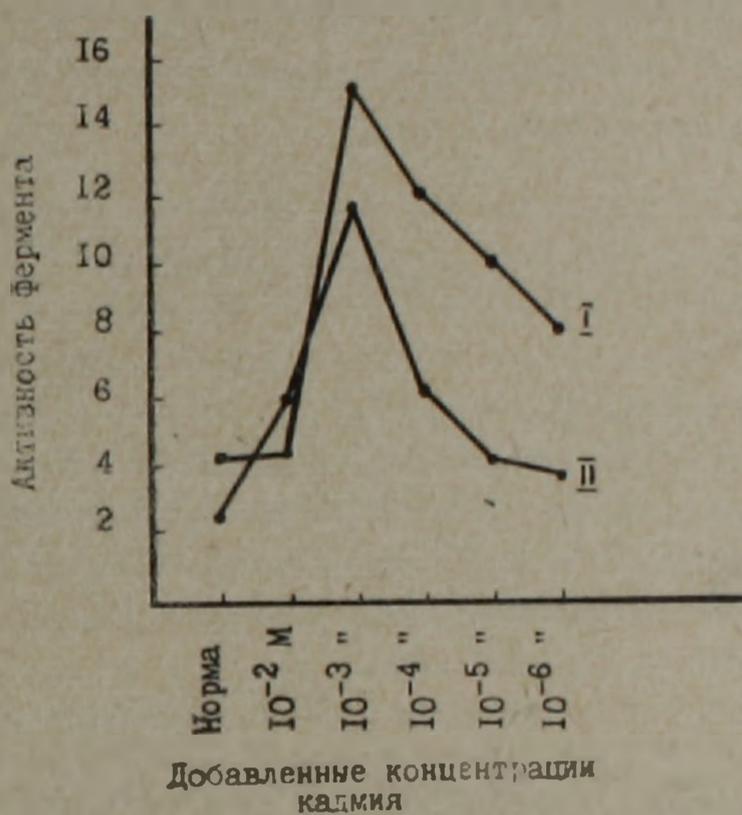


Рис. 9. I—слизистая оболочка тонких кишок, II—почки.

ные данные показывают, что большие концентрации кадмия (10^{-3} М) не оказывают влияния на активность фермента почек, однако уже 10^{-3} М резко повышает ее как в почках, так и в слизистой оболочке тонких кишок. При понижении концентрации реагента активность фермента постепенно снижается, не доходя до нормы в обеих тканях. В то же время кадмий в концентрации 10^{-6} М не изменяет активности фермента почек, тогда как в слизистой оболочке тонких кишок эффект повышения ее достигает почти половины максимальной величины.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 19.VI 1972 г.

Գ. Ք. ԱՂՈՒՆՅ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

ՄԻ ՔԱՆԻ ԱԶԳԱԿՆԵՐԻ ՄԱՍՆԱԿՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՄԵՋ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հողվածքում քննարկվում է սպիտակ առնետների երիկամների և բարակ աղիների լորձաթաղանթի հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության կարգավորման հարկանական մեխանիզմը՝ ազդեցությունից և ասկորբինաթիթվի կողմից: Այդ

հյուսվածքների համոզենատները ամբողջովին չեն ցուցաբերում իրենց ֆերմենտատիվ ակտիվությունը՝ առանց վերը նշված միացությունների:

Ադրենալինի և ասկորբինաթթվի դերը կայանում է նրանում, որ ֆերմենտի ոչ ակտիվ մուլեկուլը վեր է ածվում ակտիվ ձևի: Ֆերմենտի ոչ ակտիվ ձևը այն է, որտեղ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի ցինկը միացած է SH-խմբերի հետ: Երբ թիուլային թույլների օգնությամբ SH-խմբերը հեռացվում են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոններից, ֆերմենտի ակտիվությունը կրկնապատկվում կամ եռապատկվում է:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս ենթադրելու, որ օրգանիզմում հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության կանոնադրման գործում ադրենալինը և ասկորբինաթթուն կարևոր դեր ունեն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ադուլց Գ. Դ. Изв. АН АрмССР, 15, 1, 1962.
2. Ադուլց Գ. Դ., Տարկիսյան Լ. Վ. Изв. АН АрмССР, 15, 7, 1962.
3. Ադուլց Գ. Դ., Տարկիսյան Լ. Վ. Вопросы биохимии, 3, 115, 1963.
4. Ադուլց Գ. Դ., Տարկիսյան Լ. Վ. Изв. АН АрмССР, 17, 10, 51, 1964.
5. Вильямс Р. Дж. V международный биох. конгресс, 1961.
6. Кафиани К. А. Ферменты, М., 269, 1964.
7. Крепс Е. М., Смирнов А. А., Четвериков Д. А. Биохимия нервной системы. Киев, 125, 1954.
8. Торчинский Ю. М. Успехи совр. биол., 51, 3, 261, 1961.
9. Торчинский Ю. М. Биохимия, 29, 534, 1964.
10. Anderson H. B. BBA., 54, 110, 1961.
11. Bethen F., De Duve C. Biochem. J., 50, 174, 1951.
12. Drabkin D. L., Marsh J. B. J. Biol. Chem., 168, 777, 1947.
13. Kitayama H. Y., Wakayama T. Med. Soc., 10, 4, 1063, 1959.
14. Kolthoff L. M., Stricks W. J. Amer. Chem. Soc., 73, 1728, 1951.
15. Philo A., Change R. J. Biol. Chem., 297, 1356, 1962.
16. Willer B. H. J. Cell. Compar. Physiol., 43, Suppl. 1, 307, 1954.