

Л. В. САРКИСЯН, Г. Т. АДУНЦ, В. О. БАРСЕГЯН, Г. Г. АДУНЦ

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ВЫВЕРНУТЫХ ОТРЕЗКАХ И ГОМОГЕНАТЕ ТОНКИХ КИШОК БЕЛЫХ КРЫС

Сравнительное изучение активности фермента в цельной ткани и гомогенате под действием цистенна показало, что подавляющее действие цистенна отличается по силе, ингибитор проявляет дифференциальное отношение к целостной системе и гомогенату. Регуляция же ферментативной деятельности в целостной системе отличается от таковой гомогената, поскольку эта система в нем нарушена.

Одной из основных проблем современной биохимии является деятельность ферментов и их регуляция. При изучении ферментативных процессов и их регуляторных механизмов обычно используются чистые ферменты или гомогенаты тканей. Полученные закономерности не всегда отражают истинную картину этих процессов в целом организме или в целостных системах.

При гомогенизировании тканей происходит ряд изменений в структуре клеток, при этом нарушается их целостность, что может резко повлиять на полученные данные и вызвать ряд изменений с ферментом. По мнению Нейландса и Штумпфера [1], при гомогенизировании тканей на ферментативную активность могут влиять по крайней мере три фактора: эффект разбавления суспендирующей средой во время гомогенизации; тормозящее действие, связанное с освобождением веществ из клеточных фрагментов; разрушающее действие таких процессов, как аутолиз, которые изменяют структуру ферментных белков, понижая их ферментативную активность.

В этом отношении привлекает внимание динамика активности щелочной фосфатазы в цельной ткани и гомогенате, поскольку в литературе существуют разногласия относительно механизма регуляции чистых ферментов, ферментов в гомогенате и ферментов организма.

Цель настоящей работы—сравнительное изучение активности щелочной фосфатазы под влиянием ингибитора как в гомогенате, так и в цельной ткани во времени.

Материал и методика. Исследовалась активность щелочной фосфатазы в различных частях тонких кишок белых крыс. Весь отдел тонких кишок разделили приблизительно на четыре равные части: первые два отрезка соответствовали проксимальной части; третий и четвертый отрезки—дистальной части тонкой кишки. Из каждого отрезка брали по 80 мг ткани и делили ее вдоль на две равные части по 40 мг каждая. Одна часть служила контролем.

Для изучения сдвигов в активности фермента использовали два субстрата: паранитрофенилфосфат в аммиачном буфере (рН 10,5) и β -глицерофосфат натрия в медно-наловом буфере (рН 9,6) [2—5].

Для быстрой регистрации реакции нами было сконструировано специальное приспособление, с помощью которого возможно было в одной и той же пробе проследить за скоростью ферментативной реакции в течение определенного времени.

Предварительные исследования показали, что проникновение субстрата в микровиллы и контакт с ферментом происходят в течение 30 сек. Однако регистрация активности за этот промежуток времени связана с большими трудностями, поэтому для получения четких результатов наши исследования проводились в удлинненной экспозиции (3, 6, 9, 12, 15 мин). Инкубацию проводили в термостатированном сосуде введением в субстрат-буферную смесь отрезка тонкой кишки, служившего источником фермента. В качестве ингибитора применяли заранее нейтрализованный цистеин гидрохлорид в концентрации 10^{-3} М, так как при этой концентрации эффект более выражен.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что активность щелочной фосфатазы тонких кишок (гомогенат) по сравнению с другими органами высокая и при инкубации до 30 мин скорость ферментативной реакции прямолинейная [6, 7]. Одновременно было установлено, что активность фермента в гомогенате тонких кишок у крыс уменьшается в дистальном направлении. Таким образом, представляло интерес выяснить влияние ингибитора цистеина на ферментативную активность различных частей тонких кишок белых крыс и динамику активности в течение времени (15 мин).

На рис. 1 приведены данные, касающиеся первого отрезка проксимальной части тонких кишок. Они показывают, что цистеин резко подавляет активность щелочной фосфатазы в указанном отрезке, но это ингибирующее влияние во времени (3, 6, 9, 12, 15 мин) не одинаково: если в первые три минуты инкубации активность фермента угнетается на 50%, то в течение 15 мин — на 75%. В первые три минуты ингибитор подавляет активность фермента в меньшей степени, чем в дальнейшем. Такая разница в эффекте цистеина, по-видимому, обусловлена медленным проникновением его в мембрану клетки, в остальное время этот эффект почти не меняется.

Аналогичные данные (с некоторой разницей) получены относительно второго отрезка тонких кишок проксимальной части (рис. 1), но ингибирующее действие цистеина остается почти прежним.

Третий отрезок представляет первую половину дистальной части тонких кишок (рис. 2), где активность фермента выражена гораздо меньше по сравнению с проксимальной частью. Ингибирующее действие цистеина в первые три минуты составляет 23%, в остальные сроки (6, 9, 12, 15 мин) этот эффект усиливается почти в 2—3 раза, но ингибирование происходит слабее, чем в проксимальной части тонких кишок.

Что касается второй половины дистальной части тонких кишок (рис. 2), то здесь, по сравнению с проксимальной частью, выражены гораздо слабее как ферментативная активность, так и влияние ингибитора. Следует отметить, что активность щелочной фосфатазы подавляется цистеином лишь на одну треть.

Поскольку полученные нами данные свидетельствуют о неодинаковом эффекте проявления активности щелочной фосфатазы в проксимальной и дистальной частях тонких кишок, а также различном влия-

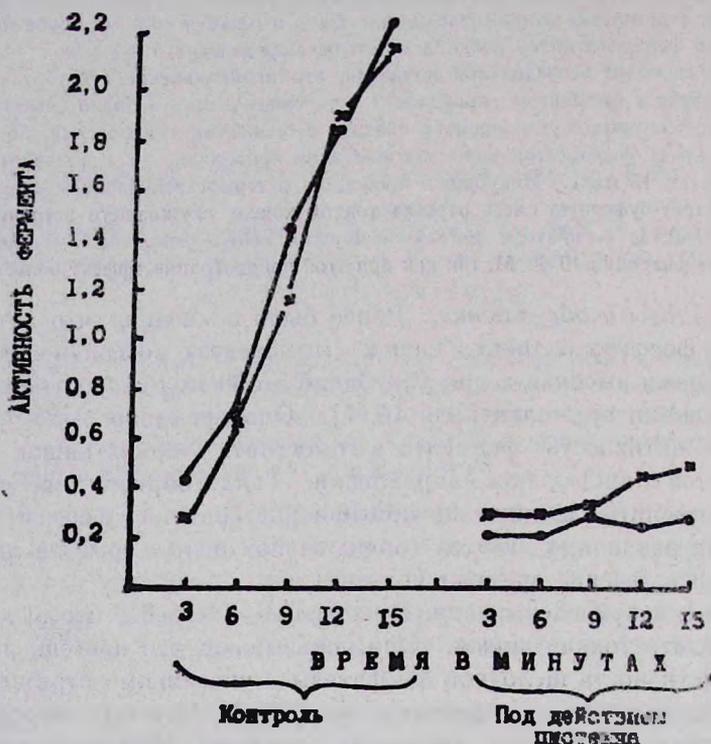


Рис. 1. Действие цистеина на активность щелочной фосфатазы двух отрезков проксимальной части срезов тонких кишок белых крыс (мг фенола/г свежей ткани).

нии на него цистеина, интересно было исследовать действие последнего на активность фермента, находящегося в разных слоях одной и той же части тонких кишок (слизистого и мышечного слоев).

Гомогенат и цельную ткань брали из слизистого и мышечного слоев тонких кишок белых крыс. Для выяснения непосредственного влияния цистеина на молекулу фермента без субстрата пробы предварительно инкубировали в течение 30 мин с цистеином и физраствором (контроль), затем добавляли субстрат (β -глицерофосфат натрия) и продолжали опыт согласно методике.

Полученные данные (рис. 3) показали, что в слизистом слое (как в гомогенате, так и в тканях) активность щелочной фосфатазы намного превалирует над активностью в мышечном слое. В концентрации 10^{-3} М цистеин резко подавляет ферментативную активность в гомогенате (около 10 раз) и несколько меньше—в цельной ткани (около 4 раз) слизистого слоя. В мышечном же слое активность фермента в гомогенате и цельной ткани проявляется значительно слабее. В гомогенате мышечного слоя она подавляется приблизительно в 10 раз; такого эффекта не наблюдается в цельной ткани мышечного слоя, где отмечается подавление активности лишь наполовину.

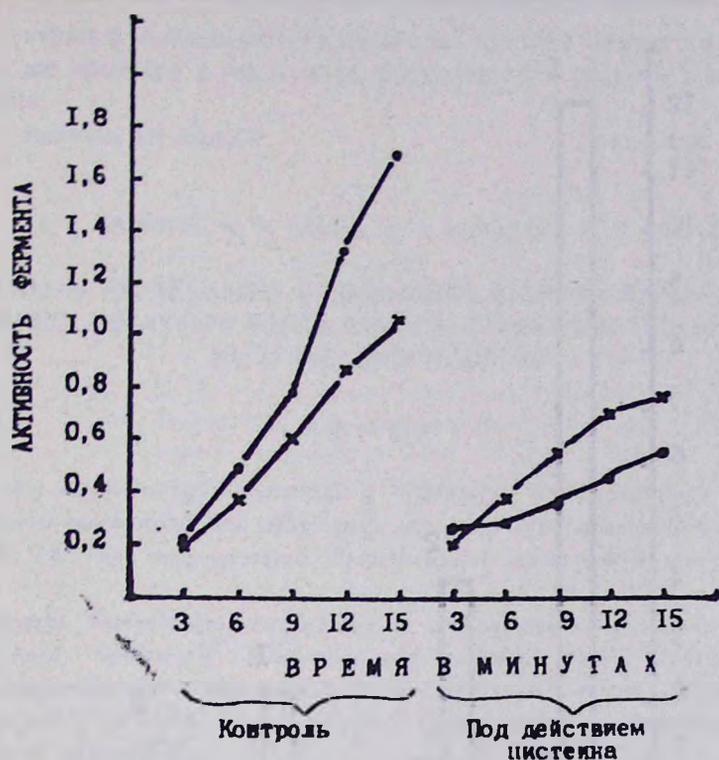


Рис. 2. Действие цистеина на активность щелочной фосфатазы двух отрезков дистальной части срезов тонких кишок белых крыс (мг фенола/г свежей ткани).

Ранее проведенные исследования [6] показали, что различные отрезки тонких кишок разных животных обладают высокой активностью щелочной фосфатазы. Если в проксимальном отрезке тонких кишок происходит интенсивный полостной и мембранный гидролиз пищевых биополимеров фосфорных соединений, то в дистальном протекают в основном процессы всасывания ряда низкомолекулярных компонентов.

Непосредственное изучение активности щелочной фосфатазы в отрезках кишок во времени и гомогенате слизистой оболочки показало ступенчатое понижение активности в каудальном направлении. Цистеин как ингибитор щелочной фосфатазы подавляет активность фермента в проксимальной части больше (около 4 раз), чем в дистальной (1,5 раза). Полученные данные показывают, что в одном и том же отрезке тонких кишок активность фермента в гомогенате резко превалирует над аналогичным показателем цельной ткани. Это свидетельствует о том, что фермент в цельной клетке не реализует весь свой потенциал, и часть его, по-видимому, связана со структурами, которые имеют непосредственное значение для регуляции ферментативной деятельности.

При гомогенизировании ткани фермент клетки из связанного состояния частично переходит в свободное и, таким образом, заметно повышает его активность. Ингибирующее действие цистеина на фермент,

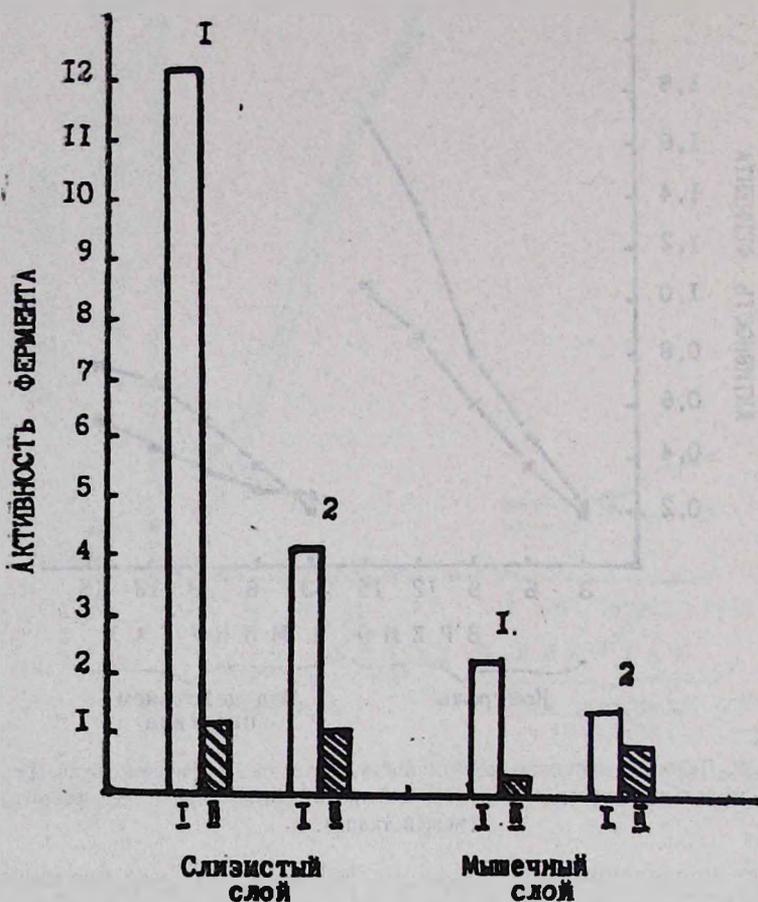


Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы в разных слоях тонких кишок белых крыс (мг/г свежей ткани). I—предынкубация с физраствором 30 мин; II—предынкубация с цистеином 30 мин; 1—гомогенат, 2—цельная ткань.

как видно из приведенных данных, в гомогенате гораздо больше, чем в интактных клетках, что, как было указано выше, может быть объяснено его связанным состоянием в клетке, а неодинаковый ингибирующий эффект цистеина в слизистом и мышечном слоях и разных частях проксимального и дистального отрезков тонких кишок может быть обусловлен различными формами фермента.

Механизм регуляции ферментативной деятельности в организме и в очищенных препаратах до настоящего времени остается в поле зрения исследователей.

Если исходить из приведенных литературных данных, то действие ингибитора на активность фермента в гомогенате и цельных тканях должно было быть неидентичным, однако, по нашим данным, эта неидентичность отличается лишь по силе своего действия. Регуляция же

ферментативной деятельности в целостной системе намного отличается от того же процесса в гомогенате, поскольку эта система в последнем нарушена.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.V 1976 г.

Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Վ. Հ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Գ. Գ. ԱԴՈՒՆՑ

ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԲԱՐԱԿ ԱՂԻՆԵՐԻ ՇՐՋՎԱԾ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐՈՒՄ
ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկա աշխատանքի նպատակն է հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության ուսումնասիրումը նոր մեթոդով՝ որոշակի ժամանակահատվածներում (3, 6, 9, 12, 15ր) ամբողջական հյուսվածքում և եկեղեցիկի արագ զրանցմամբ:

Որոշակի ժամանակահատվածներում ամբողջական հյուսվածքում և հոմոգենատում հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ ցիստեինի ճնշող ազդեցությունը տարբերվում է իր ուժով և ամբողջական հյուսվածքի ու հոմոգենատի նկատմամբ ունի դիֆերենցիալ բնույթ:

Ֆերմենտատիվ գործունեության կարգավորումը ամբողջական հյուսվածքում, տարբերվում է հոմոգենատից, քանի որ հոմոգենատում խախտված է սխտեմի ամբողջականությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Пейландс Дж., Штумпф П. Очерки по химии ферментов. М., 1958.
2. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953.
3. Шлигин Г. К., Михлин С. Я. Вopr. мед. химии, 1, 461, 1955.
4. Bodansky A. J. Biol. Chem., 101, 93—104, 1933.
5. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem. 162, 3, 421, 1946.
6. Адуңц Г. Т., Саркисян Л. В. Биологический журнал Армении, 29, 7, 23—27, 1976.
7. Booth C. C. In: Handbook of physiology sec. 6, Alimentary canal, III, Intestinal absorption. Washington, 1513—1527, 1968.