

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

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ГОМОГЕНАТОВ, ТКАНЕЙ И ОЧИЩЕННОГО ФЕРМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕКОТОРЫХ РЕАГЕНТОВ

Установлено, что активирующие и ингибирующие реагенты не проявляют своего полного действия на активность щелочной фосфатазы, находящейся в системе гомогената и ткани кишок и почек, так как фермент защищен внутренними регуляторами, предохраняющими его молекулу от внешних воздействий. Полное действие реагентов проявляется на очищенном ферменте, освобожденном от регуляторов систем.

Для изучения особенностей фермента и выяснения некоторых физико-химических параметров часто используется ряд специфических реагентов, изменяющих скорость ферментативной реакции. Такого рода исследования легко проводить с кристаллическими ферментами. Однако выявленные закономерности не всегда удается сопоставить с результатами, полученными с гомогенатами и тканями, поскольку фермент в них находится в системе. Скорость ферментативной реакции в системе зависит от ряда факторов: проницаемости вводимого вещества, нейтрализации этого вещества при соприкосновении с клеточными компонентами и образования нового комплекса.

Активность щелочной фосфатазы регулируется специфическими и неспецифическими активаторами и ингибиторами. Для деятельности этого фермента необходимы ионы цинка и магния, так как фермент является металлпротеином [1]. В настоящее время известно, что молекула щелочной фосфатазы *Escherichia coli* имеет шесть металлсвязывающих участков: два из них могут связывать магний, четыре участка соединены с цинком, в которых одна пара ионов цинка—«структурная», стабилизирующая четвертичную структуру фермента, другая пара—«каталитическая», принимающая участие либо в связывании субстрата, либо в гидролизе последнего [2, 3]. Цинк «каталитического» участка ассоциирует две субъединицы, вследствие чего фермент переходит в активное состояние.

Роль цинка в активации щелочной фосфатазы не ограничивается только ассоциацией субъединиц фермента. Высокие концентрации его (10^{-2} — 10^{-4} М) подавляют активность фермента с образованием хелатного комплекса с рядом аминокислот. Известно, что из двухвалентных металлов для хелатообразующего комплекса самыми реактивными являются медь и цинк, соединяющиеся как со свободными аминокислотами, так и с аминокислотами, входящими в состав белка.

[4]. Снижение растворимости белковой молекулы приводит к потере биологической активности фермента.

Исследованиями Матиса [5] было показано, что ряд аминокислот (в особенности аланин) активирует щелочную фосфатазу, однако Мортон, в противоположность Матису, отмечает, что активация щелочной фосфатазы аминокислотами происходит не в результате прямого их воздействия, а косвенным путем [6]. В настоящее время по этому вопросу нет единого мнения.

Установлено, что блокирование активного центра щелочной фосфатазы можно осуществлять введением цистеина [7].

Исходя из вышеизложенного, мы задались целью провести сравнительное исследование активирующего и ингибирующего влияния некоторых веществ на кишечной щелочной фосфатазе в гомогенатах, тканях и очищенном ферменте.

Материал и методика. Источником щелочной фосфатазы служили гомогенат из почек и отдельные отрезки 12-перстной кишки тонкого отдела кишок белых крыс весом 100—120 г. Для определения активности щелочной фосфатазы почек использовали β -глицерофосфат натрия (рН 9,6), а для тонкой кишки и очищенного фермента — пара-нитрофенилфосфат бария (рН 10,5) [8—10].

Для блокирования и активирования фермента были использованы цинк и цистенн в концентрациях 10^{-3} — 10^{-6} М, диэтилдитиокарбаминовокислый натрий в концентрациях 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$ М, а также глутамин, аспарагин, лизин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты в коцентрациях 10^{-2} — 10^{-4} М.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены данные, показывающие, что разные концентрации глутаминовой кислоты не одинаково-

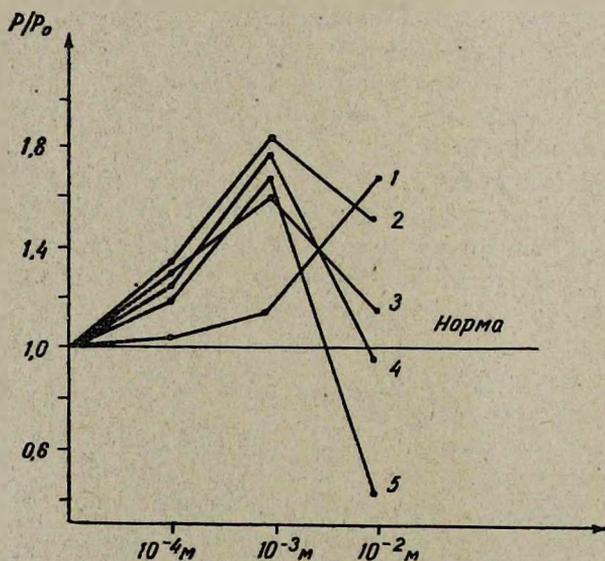


Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы почек белых крыс под воздействием различных концентраций глутаминовой, аспарагиновой кислот, лизина, арганина и глутамин. 1—глутаминовая кислота; 2—аспарагиновая кислота; 3—арганин; 4—лизин; 5—глутамин.

во повышают активность щелочной фосфатазы в почках белых крыс по сравнению с нормой. Наивысшая активность фермента отмечается при концентрации 10^{-3} М. Под действием аспарагиновой кислоты фермент проявляет максимум активности также при концентрации 10^{-3} М, однако при концентрации 10^{-2} М отмечается двукратное подавление ее. Активирующие сдвиги под воздействием лизина и глутамина почти одинаковы. Максимальная активность отмечается при концентрации 10^{-3} М (61 и 71% соответственно). Что касается аргинина, то в случае с ним активация выявляется при концентрации 10^{-4} М и некоторое повышение—при 10^{-3} М. В отличие от других аминокислот аргинин в концентрации 10^{-3} М особых сдвигов в активности фермента не вызывает.

На рис. 2 приведены данные, касающиеся влияния цинка и цистеина в концентрации 10^{-3} М, взятых как в отдельности, так и вместе, на активность щелочной фосфатазы 12-перстной части тонких кишок белых крыс с использованием пара-нитрофенилфосфата.

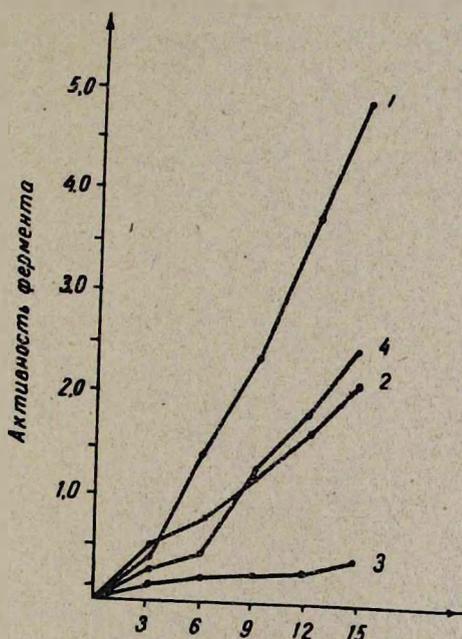


Рис. 2. Влияние цинка и цистеина на активность щелочной фосфатазы тонких кишок белых крыс. 1—норма; 2—цинк (10^{-3} М); 3—цистеин (10^{-3} М); 4—цинк + цистеин.

Поскольку ранее нами было установлено [11], что распределение щелочной фосфатазы вдоль кишок резко варьирует (уменьшается в каудальном направлении), то пробы брали с одного участка 12-перстной кишки, разделив его вдоль на четыре равные части по 40 мг каждая. Первая часть служила нормой, вторая испытывалась под действием цистеина, третья—под действием цинка, четвертая—эквивалентных количеств цинка и цистеина.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность фермента в течение 15-минутной инкубации носит прямолинейно-возрастающий характер. Цистеин в концентрации 10^{-3} М оказывает на ферментативную активность подавляющее действие (15 мин, 90% ингибирование). Цинк в концентрации 10^{-3} М за то же время подавляет активность изучаемого фермента в два раза по сравнению с первоначальной активностью. Однако при добавлении эквивалентных количеств цинка и цистеина первый снимает блокирующий эффект цистеина и даже проявляет тенденцию к некоторому повышению активности фермента, которая, однако, оказывается гораздо ниже нормы.

Приведенные данные, как было сказано, касаются отрезков тонких кишок белых крыс, в которых целостность ткани не нарушалась и, таким образом, сохранился ряд регулирующих систем ферментативной деятельности.

Интересно было проследить за действием указанных реагентов на чистом ферменте.

Использовали чистый фермент фирмы «Calbiochem», выделенный из слизистой оболочки тонких кишок телят. 1 мл раствора содержит 8,4 мг протеина, а специфическая активность составляет 86 ед.

Данные, приведенные на рис. 3, показывают влияние различных концентраций цистеина (10^{-3} — 10^{-6} М) на активность щелочной фос-

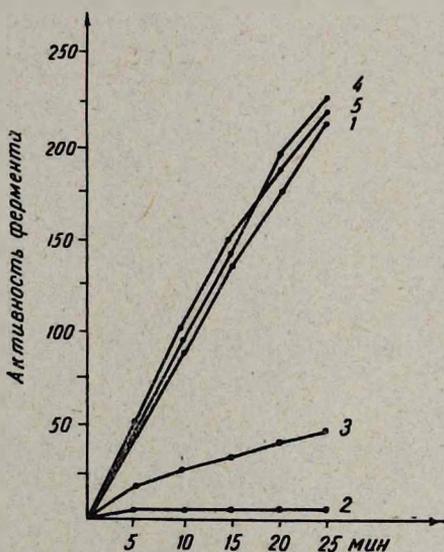


Рис. 3. Влияние различных концентраций цистеина на активность очищенной щелочной фосфатазы. 1—норма; 2— 10^{-3} М; 3— 10^{-4} М; 4— 10^{-5} М; 5— 10^{-6} М; 6— 10^{-7} М.

фатазы. Установлено, что из всех взятых концентраций лишь 10^{-3} М этого вещества дает самый высокий подавляющий эффект, снижая

ферментативную активность почти до нуля. С уменьшением концентрации до 10^{-5} М и ниже ингибирующий эффект цистеина в течение инкубации (25 мин) полностью исчезает.

Данные, приведенные на рис. 4, свидетельствуют о подавлении активности фермента цинком в концентрациях 10^{-3} — 10^{-4} М, с уменьшением концентрации подавляющий эффект исчезает. При сравнении данных рис. 3 и 4 оказывается, что ингибирующий эффект цинка намного ниже, чем цистеина. Последний в концентрации 10^{-5} М не влияет на активность щелочной фосфатазы, в то время как цинк в том же количестве сохраняет часть своего ингибирующего эффекта.

По имеющимся литературным данным [12], диэтилдитиокарбаминная кислота (ДЭДТК), соединяясь с цинком, образует хелатное соединение, давая осадок. Поскольку щелочная фосфатаза содержит 4 атома цинка, то интересно было проследить за действием ДЭДТК в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М на ее активность. Для поиска оптимальной концентрации были использованы и другие концентрации этого вещества, но оказалось, что ни одна не подавляла активность фермента, а концентрация $2 \cdot 10^{-3}$ М даже активировала его.

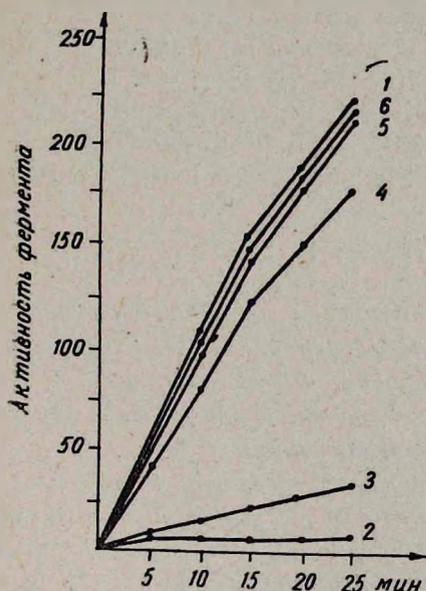


Рис. 4.

Рис. 4. Влияние различных концентраций цинка на активность очищенной щелочной фосфатазы. 1—норма; 2— 10^{-3} М; 3— 10^{-4} М; 4— 10^{-5} М; 5— 10^{-6} М; 6— 10^{-7} М.

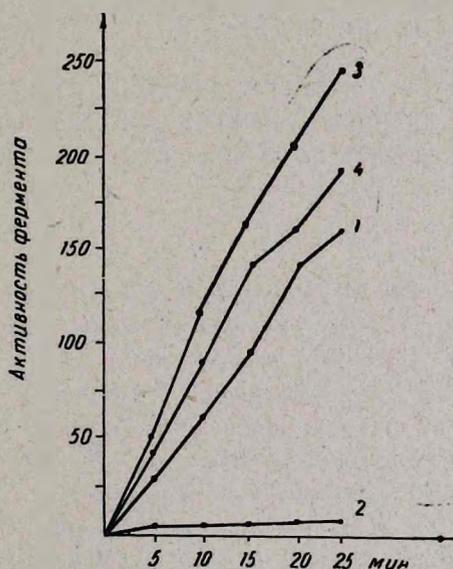


Рис. 5.

Рис. 5. Влияние цинка и ДЭДТК на активность очищенной щелочной фосфатазы. 1—норма; 2—цинк (10^{-3} М); 3—ДЭДТК ($2 \cdot 10^{-3}$ М); 4—ДЭДТК+цинк.

На рис. 5 приведены данные о влиянии цинка (10^{-3} М) и ДЭДТК ($2 \cdot 10^{-3}$ М) на очищенный фермент. Цинк в концентрации 10^{-3} М, как отмечалось выше, подавляет активность его почти полностью, а

ДЭДТК активирует на 55% от исходной активности. При одновременном добавлении цинка и ДЭДТК наблюдается повышение ферментативной активности. Таким образом, было установлено, что ингибирующее действие цинка полностью снимается ДЭДТК. Полученные результаты совпадают с данными, полученными в отношении цистеина.

Суммируя приведенные данные, можно прийти к заключению, что активирование щелочной фосфатазы гомогенатов почек белых крыс аминокислотами, по-видимому, происходит за счет стабилизации молекулы фермента, предотвращая частичную денатурацию ее.

Если фермент находится в системе, то активирующие и ингибирующие реагенты не проявляют своего действия полностью, поскольку фермент защищен внутренними регуляторами, предохраняющими молекулу его от внешних воздействий. На очищенный фермент активаторы и ингибиторы оказывают полное действие в результате освобождения от внутренних регуляторов.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.V 1977 г.

Գ. Ք. ԱՂՈՒՆՅ, Վ. Հ. ԲԱՐՍԵԳՅԱՆ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Գ. Գ. ԱՂՈՒՆՅ

ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԵՄԱՍԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՈՒՄ, ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԵՆՐՈՒՄ և ՄԱՔՐՎԱԾ ՖԵՐՄԵՆՏՈՒՄ՝ ՄԻ ՔԱՆԻ ՌԵԱԳԵՆՏՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈ

Ա մ փ ո փ ո Վ մ

Ընդհանրացնելով ներկա աշխատանքում բերված տվյալները, կարելի է եզրակացնել, որ սպիտակ առնետների երիկամների հոմոգենատի հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվացումը ամինաթթուներով, հավանաբար, տեղի է ունենում ի հաշիվ ֆերմենտի մոլեկուլի կայունացման, այսինքն՝ ամինաթթուները պահպանում են նրան մասնակի բնափոխությունից:

Սպիտակ առնետների 12-մատնյա աղիներում, բջի ստրոկտուրային էլեմենտների միջավայրում, ակտիվացնող և ճնշող ռեագենտները իրենց ազդեցությունը ամբողջովին չեն ցուցաբերում, քանի որ ֆերմենտը պաշտպանված է ներքին կարգավորիչներով, որոնք պաշտպանում են նրա մոլեկուլը արտաքին ներզործություններից:

Ինչ վերաբերում է մաքրված ֆերմենտին, ապա այս դեպքում ակտիվատորները և ինհիբիտորները ցուցաբերում են իրենց ազդեցությունն ամբողջովին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Petit C. C., Delisle M., Martel M., Fecteau C., Brier N. Can. J. Biochem. 53, 10, 1089—1100, 1975.
2. Anderson R. A., Bosron W. F., Kennedy F. S., Vallee B. L. Proc. Nat. Acad., Sci, USA, 72, 8, 2989—2993, 1975.

3. *Simpson R. T., Vallee B. L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 166, 2, 670—689, 1963.
4. *Малер Г., Кордес Ю.* Основы биол. химии, 24, М., 1970.
5. *Mathies J. C. J.* Biol. Chem., 233, 1121, 1958.
6. *Morton R. K.* Biol. J., 70, 134, 1958.
7. *Адунц Г. Т., Саркисян Л. В.* Биологический журнал Армении, 26, 2, 1973.
8. *Vodansky A. J.* Biol. Chem., 101, 93, 1933.
9. *Lowry O. H., Lopez J. A. J.* Biol. Chem., 162, 3, 421, 1946.
10. *Шлыгин Г. К., Михлин С. Я.* Вопросы мед. химии, 1, 461, 1955.
11. *Адунц Г. Т., Саркисян Л. В.* Биологический журнал Армении, 29, 7, 1976.
12. *Лазарис Я. А., Бавельский Э. Е., Корчин В. И.* Бюлл. экспер. биол. и мед., 2, 30, 1971.