

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ РАСПАДА ВОДЫ
ПОД ВЛИЯНИЕМ УЛЬТРАЗВУКА НА ОЧИЩЕННУЮ
ЩЕЛОЧНУЮ ФОСФАТАЗУ

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

Показана возможность регуляции активности очищенной щелочной фосфатазы путем изменения интенсивности ультразвука и концентрации регуляторов этого фермента, под влиянием которых образуются разные количества NO_2^- и NO_3^- , в условиях действия ультразвука блокирующих цинк активного центра и тем самым затрудняющих атаку гидроксильной группы серина на фосфор.

В последние годы ультразвук получил широкое применение в различных областях науки, в том числе и в биологии. Несмотря на это, в настоящее время мы располагаем разрозненными данными, касающимися действия этого физического фактора на биополимеры. Имеющиеся в литературе сведения не дают основания четко представить механизм действия ультразвука на изучаемый нами фермент, так как большая часть такого рода работ проводилась на гомогенатах, тканях и субклеточных фракциях [1—4]. Нам представлялось интересным выявить эффект непосредственного воздействия ультразвука на активность очищенной щелочной фосфатазы.

Материал и методика. Опыты ставились на очищенном ферменте фирмы «Calbiochem», выделенном из слизистой оболочки тонких кишок телят. В 1 мл раствора содержится 8.4 мг протейна, концентрация фермента— $2 \cdot 10^{-7}$ М. Субстратом служил пара-нитрофенилфосфат бария в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ М (рН 10.5). Активность щелочной фосфатазы определяли по Шлыгину и Михлину [5]. Данные на графиках приведены в процентах от нормы. В качестве действующего физического фактора использовался ультразвук частотой 880 кГц, интенсивностью 5 Вт/см² и длительностью воздействия 5—20 минут. Озвучивание проводилось в специальной термостатированной кювете, изготовленной нами, где температура была постоянной (25°).

Результаты и обсуждение. Данные рис. 1 показывают действие разных интенсивностей ультразвука на активность щелочной фосфатазы, измерение которой производили сразу после озвучивания фермента и при хранении его в течение 12 и 24 час. Показано, что при максимальной интенсивности ингибирующее действие ультразвука сразу после озвучивания составляет 10%, а в последующие 24 час. достигает 70%.

С целью восстановления активности сразу после озвучивания фермент подвергали диализу против дистиллированной воды в течение суток при температуре 4° . Оказалось, что диализ снимает ингибирующее действие ультразвука (рис. 2).

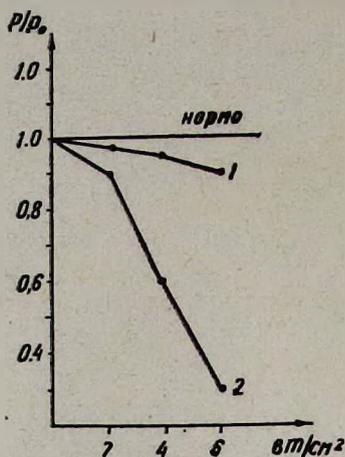


Рис. 1.

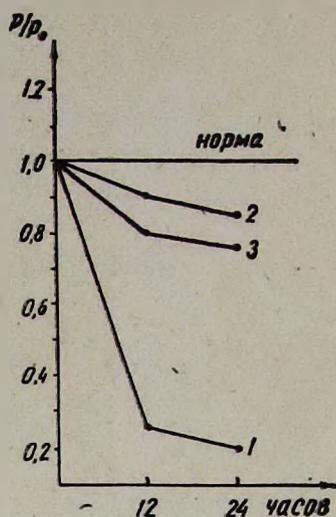


Рис. 2.

Рис. 1. Действие ультразвуковых волн разных интенсивностей на активность щелочной фосфатазы. 1—свежий фермент, 2—храненный 24 час.

Рис. 2. Активность озвученной и неозвученной щелочной фосфатазы после диализа. 1—активность озвученного фермента после хранения в течение 12 и 24 час., 2—активность фермента после диализа в течение 12 и 24 час., 3—активность озвученного фермента после диализа в течение 12 и 24 час.

Под действием ультразвуковых волн происходит сонолиз воды с образованием активных радикалов (H^{\cdot} , OH^{\cdot} , O_2^{\cdot}), при рекомбинации которых образуются молекулы H_2O_2 и ионы NO_2^- , NO_3^- [6]. Приведен спектр пропускания воды сразу после озвучивания и при хранении в течение 24 час. (рис. 3).

Спектральным методом нами была определена концентрация ионов NO_2^- , NO_3^- , которая при 10-минутном озвучивании в 10 мл дистиллированной воды составляла 10^{-6} М (рис. 4).

Учитывая это, в последующих экспериментах мы добавляли к ферменту озвученную воду и изучали динамику активности исследуемого белка.

По последним литературным данным, в молекуле щелочной фосфатазы имеется четыре металлсвязывающих участка, которые связаны с ионами цинка, из них одна пара стабилизирует четвертичную структуру фермента (структурная), другая, каталитическая, принимает участие либо в связывании субстрата с ферментом, либо в гидролизе субстрата [7].

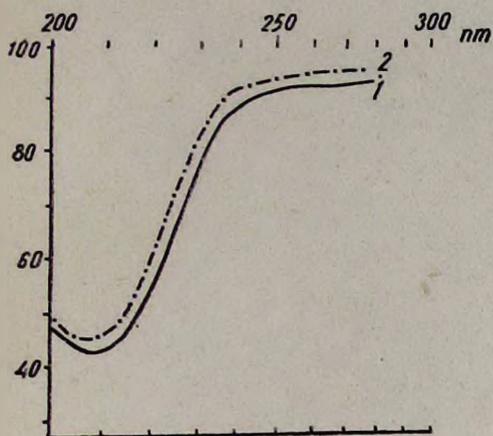


Рис. 3.

Рис. 3. Спектр пропускания дистиллированной воды после озучивания и хранения в течение 24 час. 1—спектр пропускания воды сразу после озучивания, 2—спектр пропускания озученной воды после хранения в течение 24 час.

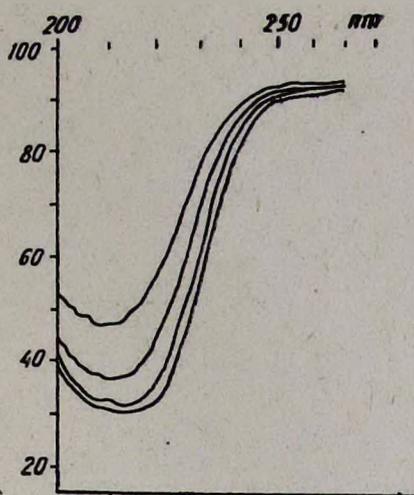


Рис. 4.

Рис. 4. Спектр пропускания NO_2^- , NO_3^- в зависимости от продолжительности озучивания: 1—после 5-минутного, 2—после 10-минутного, 3—после 15-минутного, 4—после 20-минутного.

При добавлении к ферменту активной воды с цинком (10^{-5} М) ингибирование щелочной фосфатазы не происходит (рис. 5).

Нами ранее показано, что цинк активного центра фермента блокируется SH-группами цистеина, но при добавлении эквивалентных количеств цинка и цистеина ингибирующее действие последнего снимается цинком [8]. При добавлении цистеина с активной водой ингибирование фермента наблюдается в первые 12 час. хранения, при дальнейшем хранении активность его восстанавливается (рис. 6).

Так как при воздействии ультразвука образуются супероксидальные радикалы, которые могут быть причиной ингибирования активности фермента, то нами было испытано действие активной воды в присутствии супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), для которой субстратом является супероксидальный радикал. Данные рис. 7 показывают, что супероксиддисмутаза снимает ингибирующее действие активной воды, но не полностью.

Согласно литературным данным [9—13], в активной воде одним из образовавшихся конечных продуктов является перекись водорода. В наших опытах показано, что перекись водорода является ингибитором для щелочной фосфатазы, но при комбинации с активной водой этот эффект уменьшается (рис. 8).

Для выявления характера действия H_2O и NO_2^- на металлсодержащие ферменты мы испытали действие активной воды на цитохром С.

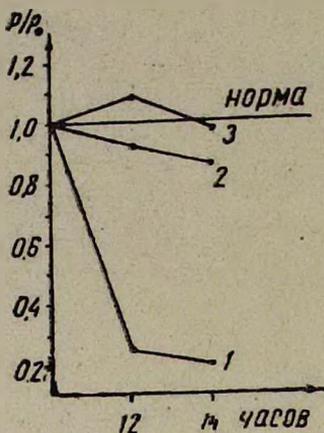


Рис. 5.

Рис. 5. Действие цинка и озученной воды на активность щелочной фосфатазы: 1—активность фермента с озученной водой, 2—активность фермента при добавлении цинка, 3—активность фермента при добавлении цинка с озученной водой.

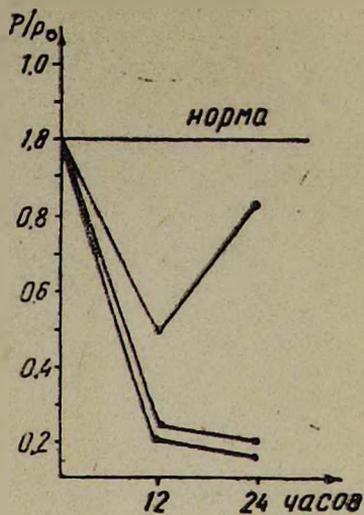


Рис. 6.

Рис. 6. Действие цистейна и озученной воды на активность щелочной фосфатазы: 1—активность фермента при добавлении озученной воды, 2—активность фермента при добавлении цистейна, 3—активность фермента при добавлении цистейна с озученной водой.

Оказалось, что восстановленная форма белка в течение 30 мин переходит в окисленную, а при дальнейшем хранении (24 час.) вновь восстанавливается (рис. 9).

На основании полученных результатов можно построить несколько возможных схем действия продуктов, образовавшихся в воде под влиянием ультразвука на щелочную фосфатазу: а) фрагментация молекулы белка, б) конформационные изменения структуры белка.

Так как не белок, а растворитель подвергается прямому действию ультразвука, то фрагментация молекулы фермента исключается. По нашим наблюдениям, произошли незначительные конформационные изменения в молекуле белка, которые в определенной мере ответственны за ингибирование фермента, в основном же этот эффект связан с действием продуктов, которые рекомбинируются из активных радикалов, образовавшихся при сонолизе воды. Этот вывод подтверждается диализом фермента с активной водой, после которого щелочная фосфатаза сохраняет активность. Вероятно, из среды выходят H_2O_2 и ионы NO_2^- , NO_3^- , исключая тем самым возможность их непосредственного контакта с активным центром фермента.

Процесс полного ингибирования фермента под действием активной воды осуществляется в течение 24 час., в то время как ингибирование под действием цистейна происходит всего лишь за несколько

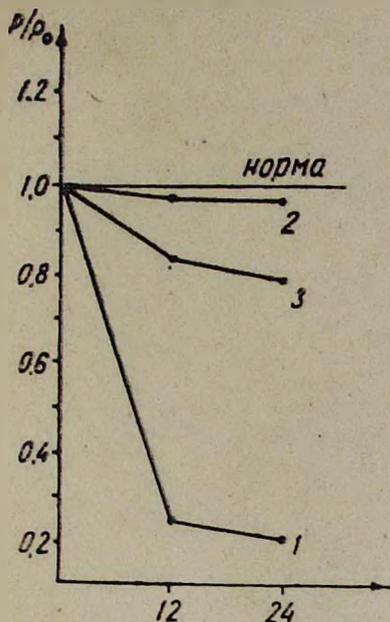


Рис. 7.

Рис. 7. Действие супероксиддисмутазы и озвученной воды на активность щелочной фосфатазы. 1—активность фермента при добавлении озвученной воды, 2—активность фермента при добавлении супероксиддисмутазы, 3—активность фермента при добавлении супероксиддисмутазы с озвученной водой.

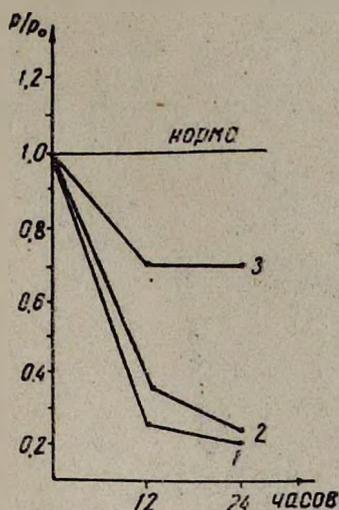


Рис. 8.

Рис. 8. Действие перекиси водорода и озвученной воды на активность щелочной фосфатазы. 1—активность фермента при добавлении озвученной воды, 2—активность фермента при добавлении перекиси водорода, 3—активность фермента при добавлении перекиси водорода с озвученной водой.

минут. Связывание цистеина с цинком активного центра происходит также значительно быстрее, чем с ионами NO_2^- , NO_3^- . Это наблюдается в начальной стадии ингибирования фермента и при дальнейшем его активировании, сопровождающемся окислением уже связанных SH-групп с цинком активного центра. В подтверждение этих предположений приведены спектры пропускания по переходу цистеина в цистин при хранении (рис. 10). При добавлении же цинка ингибирующее действие активной воды полностью снимается, так как концентрация металла в растворе увеличивается и не дает возможности ионам NO_2^- и NO_3^- связаться с цинком, играющим роль кофактора. Предполагалось, что ингибирование щелочной фосфатазы связано с образованием в активной воде перекиси водорода, однако при увеличении концентрации ее в среде, наоборот, наблюдалось повышение активности фермента, что связано с уменьшением образования ионов NO_2^- и NO_3^- .

Таким образом, активность щелочной фосфатазы можно регулировать, меняя интенсивность ультразвука и концентрации регуляторов

ферментативной активности, действие которых приводит к образованию в воде разных концентраций ионов NO_2^- , NO_3^- и молекул H_2O_2 .

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что продукты сонолиза воды, образующиеся под действием ультразвука, блоки-

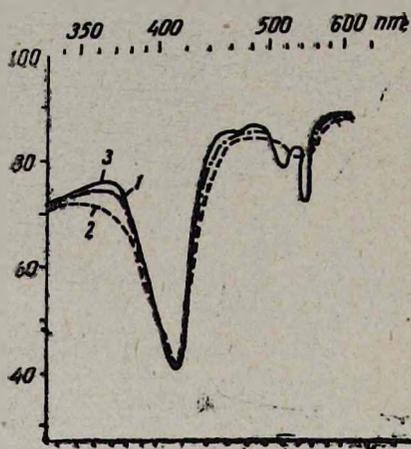


Рис. 9.

Рис. 9. Действие озвученной воды на цитохром С. 1—спектр пропускания цитохрома С, 2—спектр пропускания цитохрома С при добавлении озвученной воды, 3—спектр пропускания цитохрома С при хранении в течение 24 час. после добавления озвученной воды.

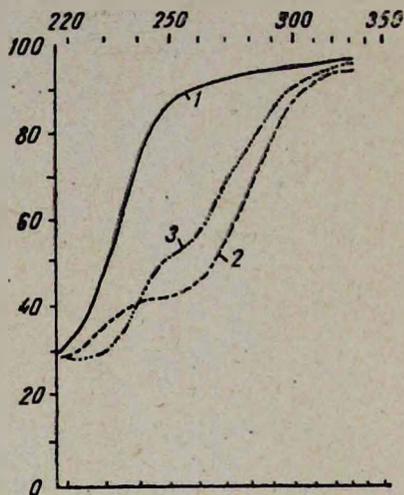


Рис. 10.

Рис. 10. Изменение спектра пропускания цистеина под действием озвученной воды. 1—спектр пропускания цистеина, 2—спектр пропускания цистеина, 3—спектр пропускания цистеина с озвученной водой при хранении в течение 24 час.

руют цинк активного центра щелочной фосфатазы, затрудняя тем самым нуклеофильную атаку гидроксильной группы серина на фосфор.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 22.II 1978 г.

**ԶՐՈՒՄ ՈՒՎՏՐԱԶԱՅՆԻ ՆԵՐԳՈՐԾՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ԱՌԱՋԱՑԱԾ
ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԸ ՄԱՔՐՎԱԾ
ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱՎՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ**

Վ. Լ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱՒՈՒՆՑ

Ուլտրաձայնի ազդեցության ներքո ջրում առաջանում են մի շարք միացություններ (NO_2^- , NO_3^- , H_2O_2), որոնք փոխազդելով ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի ցինկի հետ, ընկճում են նրա ակտիվությունը:

Պարզվել է, որ հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը կարելի է փոփոխել, փոփոխելով ուլտրաձայնի ինտենսիվությունը, ճառագայթահարման ժամանակը, ինչպես նաև ճառագայթահարումից առաջ ջուրը հագեցնելով տարբեր կոնցենտրացիայի ակտիվատորներով և ինհիբիտորներով:

MECHANISM OF ACTION OF WATER DISINTEGRATION
PRODUCTS FORMED BY ULTRA-SOUND TREATMENT
ON THE ACTIVITY OF PURIFIED ALKALINE PHOSPHATASE

W. H. BARSEGYIAN, L. W. SARKISIAN, G. T. ADUNTS

It has been shown, that the activity of purified alkaline phosphatase depends on the changes of ultra-sound treatment intensivity and the concentration of this enzyme regulators. It is accompanied with the formation of different quantities of NO_2^- , and NO_3^- . These compounds in the combination with ultra-sound treatment block zincum of the enzyme active centre and inhibit the action of hydroxyl group of serine on phosphorus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Robinson H. P., Sharp F., Donald J., Joung H., Hall A. Y.* J. Obstet. and Gynaecob. Brit. Commonw, 79, 9, 821, 1972.
2. *Timmermans L. C. r.* Soc. Biol., 167, 11, 1697, 1973.
3. *Барсегян В. О., Адуц Г. Т., Саркисян А. П.* Уч. зап. Ер. гос. ун-та, 1, 1976.
4. *Шенелева И. С., Топоров Ю. А., Топорова С. М.* Тр. выездной сессии секции «Физиологические и технические основы применения ультразвука в медицине и в физиологии», Пущино, 1976.
5. *Шлыгин Г. К., Михлин С. Я.* Вопр. мед. химии, 1, 461, 1955.
6. *Полоцкий И. Г.* Журн. общей биохимии, 17, 649, 1947.
7. *Anderson R. A., Bosron W. F., Kennedy F. S., Vallee B. L.* Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 72, 8, 2989, 1975.
8. *Адуц Г. Т., Саркисян Л. В.* Биологический журнал Армении, 26, 2, 1973.
9. *Griffing V., Fitzgerald M. E., Sullivan J. J.* Chen, Phys., 25, 926, 1956.
10. *Pospitsilova J. J.* Naturforsch, 21 B, 1230, 1966.
11. *Aubar M., Pecht J.* Phys. Chem., 68, 352, 1969.
12. *Weissber A. J.* Acoust Soc. Amer., 32, 283, 1960.
13. *Del Duca M., Jeager E., Hovorka F. J.* Acoust Soc. Amer., 30, 301, 1958.