

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ГАНГЛИОЗИДОВ НА АКТИВНОСТЬ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы МИКРОСОМ МОЗГА

Э. Е. МХЕЯН, О. П. СОЦКИЙ, С. Э. АКОПОВ

Приводятся данные о действии человеческих ганглиозидов на K^+ -фосфатазу микросом мозга белых крыс, ингибирующих активность фермента. Ионы K^+ снимают ингибирующий эффект ганглиозидов на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу и K^+ -фосфатазу. Поскольку $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза является аллостерическим ферментом, то предполагается, что ганглиозиды как аллостерические лиганды уменьшают его сродство к ионам K^+ , это и обуславливает обнаруженный эффект. Вычисление коэффициента Хилла подтверждает данное предположение.

Выяснение физиологической роли ганглиозидов, являющихся специфическими липидами мембран нервных клеток, представляет одну из основных задач современной нейробиологии. Согласно современным данным, ганглиозиды, являясь полианионами, играют важнейшую роль в функционировании биологических мембран [1], а именно, связывая ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , участвуют в переносе их через мембраны [2, 3]. Не исключено, что они влияют на процессы транспорта ионов через $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -активируемую Mg^{2+} -зависимую АТФазу (КФ 3614); особенно, если учесть корреляцию между активностью $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы и содержанием ганглиозидов в различных органах [4]. Нашими предыдущими исследованиями было показано, что ганглиозиды в различных концентрациях оказывают двойное действие на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу микросом мозга *in vitro*: в малых концентрациях они активируют транспортную АТФазу, а в больших ингибируют [5].

С целью выяснения некоторых сторон механизма влияния ганглиозидов на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу нами было изучено влияние экзогенных ганглиозидов на K^+ -фосфатазу, ответственную за третий этап переноса ионов через биологические мембраны [6].

Материал и методика. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза выделялась из больших полушарий мозга белых крыс. Ферментный препарат получали по методу Цильмера и Тарве [7]. Крыс забивали докапитацией, мозг отмывали от крови и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в растворе (10 мл на 1 г ткани), содержащем 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ трис-НСl и 0,2% дезоксихолата натрия (рН 6,83). Гомогенат центрифугировали при 30000×g в течение 1 часа. Надосадочную жидкость разводили в 7—10 раз бидистиллированной водой и центрифугировали в ультрацентрифуге VAC-60Z в течение 1 часа при 125000×g. Осадок ресуспендировали в указанном растворе, но без дезоксихолата и использовали как ферментный препарат.

Манипуляции выделения фермента производили при температуре 0—3°. Его активность определяли по приросту неорганического фосфата в реакционной смеси, содержащей 30 мМ трис-НСl, 5 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ АТФ-трис (рН 7,4); в контрольные пробы добавляли 0,2 мМ оуабайна. Реакцию начинали с добавления ферментного препарата (20—50 мкг белка). Объем проб составлял 2 мл. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 37°. Фосфор определяли по Якушевой и Орловой [8].

Активность K^+ -фосфатазы определяли в 1,5 мл смеси, содержащей 30 мМ трис-НСl, 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KCl, 3 мМ п-нитрофенилфосфата (рН 7,4). Контролем служили пробы, не содержащие KCl. Реакцию начинали с добавления ферментного препарата (20—40 мкг белка). Смесь инкубировали при 37° в течение 10 мин.

Ганглиозиды выделяли из серого вещества людей, погибших от несчастных случаев, по методу Богоча в модификации нашей кафедры [9]. Белок определяли по Лоури [10]. Полученные данные статистически обработаны с применением критерия Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Полученные данные, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что ганглиозиды в концентрациях 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$ и $3 \cdot 10^{-3}$ мМ ингибируют активность K^+ -фосфатазы соответственно на 9, 26, 49, 60, 78 и 80% (таблица).

Т а б л и ц а
Влияние ганглиозидов в различных концентрациях
на K^+ -фосфатазу in vitro, % от контроля

Концентрация ганглиозидов, мМ	Контроль, %	Опыт, %	P
10^{-5}	100	$91 \pm 1,5$	$< 0,05$
$2 \cdot 10^{-5}$	100	$74 \pm 1,83$	$< 0,05$
$6 \cdot 10^{-5}$	100	$51 \pm 0,61$	$< 0,01$
10^{-4}	100	$40 \pm 0,95$	$< 0,05$
$2 \cdot 10^{-3}$	100	$22 \pm 0,98$	$< 0,05$
$3 \cdot 10^{-3}$	100	$20 \pm 1,1$	$< 0,05$

В каждой графе—результаты обработки данных 8-ми опытов.

При этом обнаружилось, что ингибирующий эффект их зависит от времени контакта с ферментным белком. Максимум ингибирования отмечался на тридцатой минуте преинкубации ганглиозидов с белком при 37° (рис. 1).

Из полученных данных следует, что в отличие от $Na^+—K^+$ -АТФазы ганглиозиды в малых концентрациях не оказывают активирующего влияния на K^+ -фосфатазу, а проявляют слабый ингибирующий эффект. Большие концентрации ингибируют K^+ -фосфатазу в значительной степени.

Эти данные дают основание предполагать, что ингибирующий эффект ганглиозидов на $Na^+—K^+$ -АТФазу связан с их влиянием на фосфатазную реакцию, являющуюся третьей реакцией рабочего цикла фермента. Активирующий эффект малых концентраций, по-видимому, связан с их воздействием на первые этапы транспортного цикла.

В дальнейшем для уточнения механизма влияния ганглиозидов на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу и K^+ -фосфатазу нами изучалась конкуренция ганглиозидов с активирующими ионами Na и K. Результаты опытов представлены в виде графиков Гантера и Даунса [11] (рис. 2).

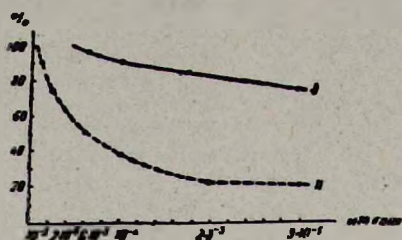


Рис. 1. Ингибирующий эффект ганглиозидов на активность K^+ -фосфатазы в зависимости от концентрации, I — без преинкубации; II — с преинкубацией в течение 30 мин при 37° .

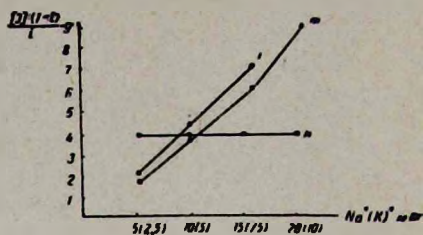


Рис. 2. Конкуренция между ганглиозидами и Na^+ или K^+ за $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу и K^+ -фосфатазу. I — конкуренция с K^+ ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза); II — конкуренция с Na^+ ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза); III — конкуренция с K^+ (K^+ -фосфатаза).

Результаты опытов показали, что ганглиозиды конкурируют с ионами K за $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу и K^+ -НФФ. Значение $\frac{[J](1-i)}{i}$ (где $[J]$ — концентрация ингибиторов, i — часть активности фермента, которая угнеталась при данной концентрации катиона) возрастало с ростом концентрации K^+ в среде (рис. 2, кр. I и III). Конкуренции же между ганглиозидами и ионами Na в наших экспериментах не обнаружено. Значение $\frac{[J](1-i)}{i}$ не возрастало с ростом концентрации Na^+ в среде (рис. 2, кр. II).

Таким образом, ионы K снимают ингибирующее действие ганглиозидов на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу, в то время как ионы Na не оказывают такого влияния. Поскольку $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза является аллостерическим ферментом [13, 12], можно предположить, что ганглиозиды как аллостерические ингибиторы в результате конформационных изменений уменьшают его сродство к K^+ , это и обуславливает обнаруженный эффект. Но так как, являясь в то же время полианионами, они способны связывать K^+ , не исключено, что в основе ингибирующего эффекта их лежит уменьшение концентрации активирующих ионов K. Для уточнения этого вопроса нами разностным методом [14] был рассчитан коэффициент Хилла по формуле:

$$\lg \left\{ \left(\frac{1}{V_0 - V_i} - \frac{1}{V_0 - V_i'} \right) / \left(\frac{1}{V_0 - V_i} - \frac{1}{V_0 - V_i''} \right) \right\} / \lg x$$

где V_0 — скорость реакции без ингибитора, V_i , V_i' , V_i'' — значения скоростей реакции при концентрациях ингибитора, соответственно равных J , J/χ , $\chi \cdot J$. Было принято равным 2.

Поскольку коэффициент Хилла оказался больше 1 (1,93), то мы пришли к выводу, что имеем дело с кооперативным процессом, еще раз подтверждающим аллостерическую природу изучаемого фермента.

Ереванский медицинский институт,
кафедра общей и клинической химии

Поступило 25.XI 1977 г.

ՈՒՂԵՂԻ ՄԻԿՐՈՍՈՄՆԵՐԻ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ԱՏՖ}$ -ազայի ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԳԱՆԳԼԻՈԶԻՆՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ

Է. Ե. ՄԽԵՅԱՆ, Օ. Պ. ՍՈՏԿԻ, Ս. Է. ԱԿՈՊՈՎ

Հորվածում բերված են տվյալներ մարդու գանգլիոզիդների ազդեցության վերաբերյալ՝ ապիտակ առնետների ուղեղի միկրոսոմների K^+ -ֆոսֆատազայի վրա: Գանգլիոզիդների 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$ mM կոնցենտրացիաները ընկճում են K^+ -ֆոսֆատազայի ախտիվությունը համապատասխանաբար՝ 9, 26, 49, 60, 78 և 80%-ով: K^+ -իոնները վերացնում են գանգլիոզիդների ընկճող ազդեցությունը $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ԱՏՖ}$ -ազային և K^+ -ֆոսֆատազայի վրա: Քանի որ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ԱՏՖ}$ -ազան ալոստերիկ ֆերմենտ է, ենթադրվում է, որ գանգլիոզիդները իբրև ալոստերիկ ինհիբիտորներ, իջեցնում են ֆերմենտի խնամակցությունը K^+ -ի հանդեպ, որը և պայմանավորում է հայտնաբերված էֆեկտը: Հիլի գործակցի հաշվումը հաստատում է տվյալ ենթադրությունը:

ON THE MECHANISM OF INFLUENCE OF GANGLIOZIDES ON THE ACTIVITY OF $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -ase OF THE BRAIN MICROSOMES

E. E. MKHEYAN, O. P. SOTSKY, S. E. AKOPOV

The data are brought out in the article on the operation of human gangliozides on K^+ -phosphatase of white rat brain microsomes. The gangliozides in the concentrations of 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$ mM inhibit the activity of K^+ -phosphatase on 9, 26, 49, 60, 78, 80% accordingly. Ions of K^+ removed the inhibiting effect of gangliozides on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -ase in an allosteric enzyme. Then it is supposed, that gangliozides being allosteric inhibitors, reduce the affinity of the K^+ enzyme which stipulates the revealed effect. The calculation of Hill's coefficient proves the given supposition.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Туманова С. Ю. Успехи современной биологии, 81, 193, 1976.
2. Mc. Ilwain H. Biochem. J., 72, 24, 1961.
3. Woodman R. J., Mc. Ilwain H. Biochem. J., 79, 1, 1961.
4. Брновицкая З. Г. Нейрохимия, Ростов, 1976.
5. Мхейан Э. Е., Соцкий О. П., Акопов С. Э. Журн. exper. и клин. мед., 3, 1978

6. Комкова А. И. Биохимия, 39, 235, 1975.
7. Цильмер М. К., Таряе У. С. Укр. биохим. журн., 47, 458, 1975.
8. Якушева И. А., Орлова Л. И. Лаб. дело, 8, 497, 1970.
9. Мхелян Э. Е., Шахбатьян Ш. Л. Вопросы биохимии мозга, 10, 187, Ереван, 1975.
10. Loury O. U., Rosebroregh N. I., Farr A. Z., Rande R. I. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
11. Hunter A., Downs G. E. J. Biol. Chem., 154, 427, 1945.
12. Whittam R., Wheeler K. P. Ann. Rev. Physiol., 32, 21, 1965.
13. Squires R. F. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 19, 27, 1965.
14. Курганов Б. И. В. кн. Аллостерическая регуляция действия ферментов. 87, М., 1971.