

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ТРИМЕТАФОСФАТАЗЫ ТКАНЕЙ БЕЛЫХ КРЫС И КУР

И. Г. АСЛАНЯН, Г. Т. АДУНЦ, А. А. ГАСПАРЯН

Изучалась активность неорганической триметафосфатазы в гомогенатах и субклеточных фракциях тканей (печень, почки, слизистая оболочка тонких кишок, мозг, сердечная мышца, мышцы) крыс и кур, а также влияние $MgCl_2$ и NaF на нее. Полученные результаты свидетельствуют о значительной тканевой гетерогенности фермента.

Процесс образования богатых энергией фосфорных соединений в клетке, в частности аденозинтрифосфата (АТФ), имеет важное значение. Однако такие простейшие накопители энергии в живой клетке, как неорганические полифосфаты, выявленные в настоящее время почти у всех представителей живой природы, в том числе и у высших растений и животных, мало изучены. Известные нам исследования ферментов, участвующих в превращениях неорганических полифосфатов, относятся больше к микроорганизмам. У высших животных и растений неорганические полифосфаты обнаружены в небольшом количестве. Приходящийся на их долю фосфор, по современным данным [1], составляет в одном г сырой ткани этих организмов лишь десятки, максимум сотни микрограмм, тогда как у дрожжей, например, может составлять 10—20% от сухого содержимого их клеток. Поэтому именно у микроорганизмов наиболее подробно изучен их обмен. Что касается высших организмов, до последнего времени не предпринималось попыток широкого изучения неорганических полифосфатов и ферментов их обмена. Возросший за последние годы интерес к изучению свойств неорганических полифосфатов объясняется выявлением широкого спектра деятельности этих ферментов.

В свете вышензложенного становится очевидным целесообразность изучения свойств триметафосфатазы—одного из ферментов, участвующих в метаболизме конденсированных полифосфатов.

В настоящей работе рассматриваются некоторые вопросы, связанные с неорганической триметафосфатазой в различных тканях белых крыс и кур.

Материал и методика. Опыты ставили на гомогенатах и субклеточных фракциях печени, почек, слизистой оболочки тонких кишок, мозге, сердце и мышцах крыс и кур. Отдельные клеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования по схеме, предложенной Пери и Греем [2]. В качестве субстрата использовали триметафосфат Na_3 . Активность триметафосфатазы определяли методом Берга [3].

кислой фосфатазы—методом Боданского [4], неорганический фосфат—Лаури и Лопеса [5]. Инкубационная смесь содержала 1 мл гомогената ткани или соответствующей субклеточной фракции (разбавление 1/25 или 1/10 *в/об* соответственно), 2,5 мл субстрата, приготовленного на медиаловом буфере (рН 5 и 9,6), 0,5 мл соответствующего реагента (NaF и $MgCl_2 \cdot 10^{-2}$, 10^{-3} , 10^{-4} М). Реакцию останавливали 40%-ной трихлоруксусной кислотой после часовой инкубации при 37°. Активность триметафосфатазы (КФ 3.6.1.2.) выражали в мкМ Р/г ткани. Повторность опытов 7-кратная.

Результаты и обсуждение. Так как кислая фосфатаза и триметафосфатаза действуют в одном диапазоне рН и продуктом их деятельности является неорганический фосфат, мы вначале задались целью доказать, что изучаемый нами фермент является именно триметафосфатазой, в связи с чем изучалось влияние термообработки на активность обоих указанных ферментов на одной из изучаемых тканей крыс (мозг). Результаты наших исследований показали, что при температурной обработке гомогената мозга крыс в течение 10 мин при 37, 45, 60, 70° активность обоих ферментов проявляется по-разному: триметафосфатаза более термостабильна, чем кислая фосфатаза. Обработка гомогената при 60° приводит к полному исчезновению активности кислой фосфатазы, у триметафосфатазы она на довольно высоком уровне (табл. 1). В норме активность кислой фосфатазы в мозге намного ниже три-

Т а б л и ц а 1
Активность триметафосфатазы и кислой фосфатазы
при температурной обработке гомогенатов
мозга крыс, мкМ Р/г ткани

Т р и м е т а ф о с ф а т а з а			
Контроль	45°	60°	70°
41,8	48	35,4	0
К и с л я я ф о с ф а т а з а			
15,1	20,6	0	0

метафосфатазной. Ферменты, катализирующие родственные реакции, способны в известной мере, компенсировать деятельность друг друга. Однако в подобных случаях исключается возможность большого сродства фермента к чужому субстрату. Этот факт также подтверждает то, что триметафосфат расщепляется специфической триметафосфатазой. О различных свойствах этих ферментов свидетельствуют и кривые рН (рис. 1).

Нами изучалась в сравнительном аспекте активность триметафосфатазы при кислом и щелочном значении рН в гомогенатах тканей белых крыс (табл. 2). Как видно из таблицы, наивысшей триметафосфатазной активностью обладают почечная и печеночная ткани по сравнению с остальными. Причем при щелочном значении рН она выражена слабее, чем при кислом. В слизистой оболочке тонких кишок ак-

тивность фермента нами не обнаружена, а в сердечной ткани триметафосфатаза при обоих значениях рН проявляет одинаковую активность.

Исследования показали, что наивысшей активностью триметафосфатазы при рН 5 отличаются почки, печень, слизистая оболочка тон-

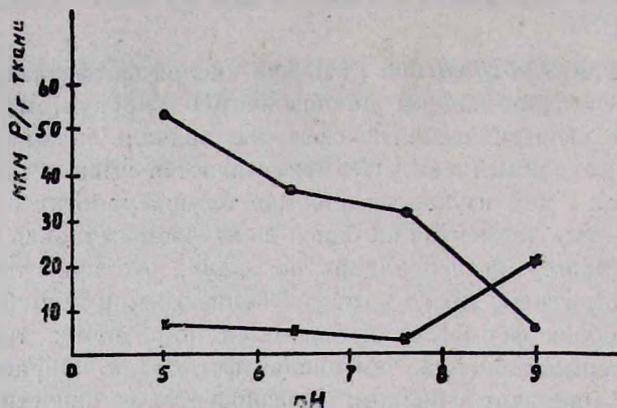


Рис. Активность триметафосфатазы и фосфатазы при разных значениях рН. ● — триметафосфатаза, ✱ — фосфатаза.

ких кишок и мозг кур (табл. 2). В других тканях активность фермента заметно ниже. При рН 9,6 она выражена значительно слабее, а в некоторых органах вообще отсутствует (сердце, мозг).

Представляет интерес изучение триметафосфатазного баланса в различных тканях крыс и кур на субклеточном уровне (табл. 3). Приведенные нами данные характеризуют особенности распределения триметафосфатазы в тканях крыс (рН 5). Высокой активностью триметафосфатазы в почках отличаются фракции митохондрии и цитоплазма+микросомы, более низкой—ядерно-миофибриллярная. В печеночной ткани все три фракции (цитоплазма+микросомы, митохондрии, ядерно-миофибриллярная) обладают почти одинаковой активностью фермента. Мозговая ткань отличается низкой активностью фермента в митохондриях, и высокой—в ядрах. Не обнаружена активность фермента в цитоплазме, в слизистой оболочке тонких кишок она выявляется во всех трех фракциях, при наивысшем проявлении в митохондриях. Небезынтересно отметить, что, согласно некоторым литературным данным [6], высокомолекулярные неорганические полифосфаты, как и ферменты их обмена, отсутствуют в митохондриях животных. Нами было установлено, что активность триметафосфатазы в почках, мозге, слизистой оболочке тонких кишок наблюдается в митохондриях, в сердечной мышце и мышечной ткани в цитоплазме и митохондриях—не обнаружена, в основном она сосредоточена в ядерно-миофибриллярной фракции.

В тканях кур триметафосфатазная активность распределена равномерно по всем трем фракциям в печени. В почках наивысшей активностью отличаются митохондрии, в мозге—ядерно-миофибриллярная

Т а б л и ц а 2

Активность триметафосфатазы при двух значениях рН (5 и 9,6) в тканях крыс и кур, мкМ Р/г ткани

рН 5	рН 9,6	рН 5	рН 9,6
К Р Ы С Ы			
П е ч е н ь		П о ч к и	
$54,1 \pm 2,2$ $p > 0,001$	$10,7 \pm 2,8$ $p < 0,01$	71 ± 7 $p < 0,005$	$21,1 \pm 2,1$ $p < 0,005$
Слизистая тонких кишков		М о з г	
$29,6 \pm 1,3$ $p < 0,01$	0	$30 \pm 3,4$ $p < 0,01$	0
С е р д ц е		М ы ш ц ы	
$11,3 \pm 1,3$ $p < 0,025$	$14,1 \pm 2,2$ $p < 0,01$	$17,9 \pm 0,8$ $p < 0,001$	$5,8 \pm 1,3$ $p < 0,025$
К У Р Ы			
П е ч е н ь		М о з г	
$52,7 \pm 3,5$ $p < 0,05$	$4,2 \pm 0,25$ $p < 0,001$	$62,2 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$12,7 \pm 2,2$ $p < 0,05$
Слизистая тонких кишков		М о з г	
$50,3 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$8,6 \pm 1,1$ $p < 0,025$	$37,9 \pm 3,2$ $p > 0,01$	0
С е р д ц е		М ы ш ц ы	
$16,9 \pm 1,1$ $p < 0,01$	0	$11,9 \pm 1,8$ $p < 0,025$	$8,3 \pm 0,54$ $p < 0,025$

фракция, в цитоплазматической фракции мозга активность не обнаружена. В мышцах она сосредоточена во фракции цитоплазма+микросомы, а в остальных фракциях—практически отсутствует. В сердечной мышце распределена по фракциям цитоплазма+микросомы и ядерно-миофибриллярной. Наивысшая активность наблюдается в ядрах.

Изучение субклеточной локализации триметафосфатазы имеет значение для выяснения некоторых интимных механизмов действия фер-

Таблица 3

Активность кислой триметафосфатазы в субклеточных фракциях тканей
крыс, кур, мкМ Р/г ткани

Гомогенат	Цитоплазма+микросомы	Митохондрии	Ядра	Гомогенат	Цитоплазма+микросомы	Митохондрии	Ядра
К Р Ы С Ы							
Печень				Почки			
59±1,3 p<0,001	11,7±2,5 p<0,025	18,1±3,6 p<0,05	12,7±1,7 p<0,01	32,1±1,2 p<0,001	16±2 p<0,01	12,9±2,2 p<0,025	3,6±0,6 p<0,025
Слизистая тонких кишок				Мозг			
36,2±0,8 p<0,001	10,7±2 p>0,025	23,5±1,3 p<0,001	10,3±3,1 p<0,05	43,2±0,4 p<0,001	0	17,1±0,83 p<0,05	55,6±2,1 p<0,001
Сердце				Мышцы			
17,9±0,8 p<0,001	0	0	10,5±1,1 p<0,01	14±1,2 p<0,01	0	0	8,5±0,9 p<0,01
К У Р Ы							
Печень				Почки			
53±3,4 p<0,005	17±1,4 p<0,005	15±0,9 p<0,005	13±0,6 p>0,005	62,2±2,5 p>0,001	9,2±1,4 p>0,01	27±1,9 p>0,005	21,8±3 p<0,025
Слизистая тонких кишок				Мозг			
50,3±1,5 p<0,001	14,7±0,2 p<0,05	5,4±0,6 p<0,01	21,8±1,8 p<0,001	40,4±3,3 p<0,005	0	6,9±0,7 p>0,05	25,9±1,9 p<0,005
Сердце				Мышцы			
18±1,2 p<0,005	9,9±0,9 p>0,01	0	7±0,5 p<0,01	11,9±0,9 p<0,01	9,8±0,3 p=0,1	0	0

мента. Кроме того, эти сравнительные данные позволяют в дальнейших экспериментах остановить выбор на тех тканях, которые отличаются высоким уровнем ферментативной активности.

Нами также исследовалась активность триметафосфатазы в тканях крыс и кур под влиянием активаторов и ингибиторов фосфатаз. В

Таблица 4

Влияние $MgCl_2$ и NaF на активность кислой триметафосфатазы в тканях
крыс и кур, в мкМ Р/г ткани

Контроль:	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-4} М	Контроль	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-4} М
1	2	3	4	5	6	7	8

К Р Ы С Ы

$MgCl_2$

Печень				Почки			
$59,6 \pm 2,6$ $p < 0,001$	$58,9 \pm 1,6$ $p < 0,001$	$70,5 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$53,3 \pm 2,6$ $p < 0,001$	$31,7 \pm 2,1$ $p < 0,05$	$34,7 \pm 2,7$ $p < 0,001$	$50,7 \pm 1,6$ $p < 0,001$	$37,4 \pm 2,8$ $p < 0,001$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$32,1 \pm 3$ $p > 0,01$	$2,6 \pm 0,5$ $p < 0,025$	$31 \pm 1,7$ $p > 0,005$	$52 \pm 1,1$ $p < 0,001$	$46 \pm 2,5$ $p > 0,005$	$42,3 \pm 4$ $p < 0,01$	$53,4 \pm 1,2$ $p > 0,005$	$39,4 \pm 4$ $p > 0,005$
Сердце				Мышцы			
$20,8 \pm 4$ $p > 0,025$	$23,1 \pm 4,5$ $p < 0,01$	$37 \pm 1,7$ $p < 0,001$	$27,2 \pm 3,4$ $p > 0,005$	$15,3 \pm 1,5$ $p > 0,01$	$20,2 \pm 4$ $p < 0,025$	$32,7 \pm 3$ $p < 0,01$	$10,4 \pm 2$ $p > 0,05$

NaF

Печень				Почки			
$74,2 \pm 3,4$ $p > 0,001$	$60,8 \pm 1,5$ $p > 0,001$	$49,7 \pm 2,4$ $p < 0,01$	$21,7 \pm 3,5$ $p < 0,01$	$58 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$42,9 \pm 3,7$ $p < 0,005$	$38,2 \pm 2,5$ $p < 0,005$	$17 \pm 1,4$ $p > 0,005$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$32 \pm 2,5$ $p > 0,005$	$2,63 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$2,6 \pm 0,4$ $p < 0,01$	$142,7 \pm 3,6$ $p < 0,001$	$38,8 \pm 2,1$ $p < 0,001$	42 ± 2 $p < 0,01$	13 ± 2 $p < 0,025$	$15,6 \pm 2,5$ $p < 0,01$
Сердце				Мышцы			
$20,7 \pm 3,8$ $p < 0,01$	$24,5 \pm 3,3$ $p < 0,01$	$8,7 \pm 2,5$ $p < 0,05$	$11,2 \pm 2,4$ $p < 0,1$	$16,5 \pm 2$ $p < 0,01$	$8,9 \pm 2,2$ $p < 0,025$	$9,4 \pm 1,7$ $p < 0,01$	$9,9 \pm 0,6$ $p < 0,001$

1	2	3	4	5	6	7	8
К У Р Ы							
MgCl ₂							
Печень				Почки			
57,8±3,5 p=0,025	68±2,4 p<0,001	70±1,7 p<0,001	52,3±2,2 p<0,01	43,3±2,8 p<0,025	23,32±2,4 p=0,05	20±1,6 p<0,01	30,3±2,1 p<0,005
Слизистая тонких кишок				Мозг			
48,1±2,7 p>0,001	56,1±3,2 p<0,01	58,3±1,4 p<0,001	41,3±2,6 p<0,005	39,5±1,4 p>0,005	56±1,2 p>0,001	49±0,9 p>0,001	34,4±1,5 p>0,005
Сердце				Мышцы			
20±1,9 p<0,005	18±1,8 p<0,005	15,1±0,8 p=0,05	17,5±0,8 p=0,025	17,5±0,7 p<0,01	20,4±0,56 p>0,01	21,8±0,9 p>0,001	23,6±1 p<0,001
NaF							
Печень				Почки			
49±2,1 p<0,005	10,7±1,3 p<0,01	20,4±2,1 p=0,01	38,3±2 p=0,05	40±1,3 p>0,005	4,6±0,5 p<0,01	27,4±1,8 p>0,005	27±2 p<0,005
Слизистая тонких кишок				Мозг			
50,1±2,1 p<0,001	32±1,9 p>0,005	17,5±1,1 p>0,005	50±1,7 p>0,005	35,9±2 p>0,005	8,5±0,9 p>0,025	10,4±1,1 p<0,01	19±2 p>0,02
Сердце				Мышцы			
16,2±1,4 p>0,01	3,4±0,4 p>0,025	7,2±0,9 p<0,01	12,1±1 p<0,005	13,4±0,6 p>0,001	6,2±0,5 p<0,005	5,6±0,8 p>0,025	12,8±0,6 p>0,01

качестве ингибитора использовали классический ингибитор фосфатаз NaF, в качестве активатора—MgCl₂ в разных концентрациях.

Как показано в табл. 4, MgCl₂ в концентрации 10⁻³ М повышает активность триметафосфатазы во всех взятых тканях крыс, за исключением слизистой оболочки тонких кишок. NaF в концентрациях 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ М оказывает сильное ингибирующее воздействие на активность фермента почти во всех тканях крыс, кроме мозга. В слизистой оболочке тонких кишок NaF при 10⁻² и 10⁻³ М резко понижает активность фермента, при 10⁻⁴ М наблюдается резкое повышение ее.

Из табл. 4 следует, что $MgCl_2$ в концентрации 10^{-2} М и 10^{-3} М активизирует фермент в печени, слизистой оболочке тонких кишок, в мозге и мышцах кур, и понижает ее активность в почках и частично в сердце во всех взятых концентрациях. NaF резко ингибирует активность триметафосфатазы всех взятых тканей кур и только 10^{-4} М не оказывает существенного влияния на слизистую оболочку тонких кишок, на печеночную и мышечную ткани.

Полученные результаты в отношении действия вышеназванных реагентов на триметафосфатазу отдельных тканей крыс и кур свидетельствуют о значительной тканевой и видовой гетерогенности триметафосфатазы.

Проведенные исследования позволили установить некоторые особенности неорганической триметафосфатазы и произвести выбор наиболее интересного источника для наших последующих изучений.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 22.II 1978 г.

ՀԱՎԵՐԻ ԵՎ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԱՆՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՏՐԻՄԵՏԱՖՈՍՖԱՏԱԶԱԶՆԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ի. Հ. ԱՍԼԱՆԻԱՆ, Գ. Բ. ԱԴՈՒՆՏ, Ա. Հ. ԳԱՍՊԱՐԻԱՆ

Հետազոտվել է տրիմետաֆոսֆատազայի ակտիվությունը հավերի և սպիտակ առնետների հյուսվածքների (թոքերի, երիկամների, բարակ աղիների լորձաթաղանթի, ուղեղի, սրտամկանի, մկանների) հումագենատների և ենթաբջջային ֆրակցիաների վրա, ինչպես նաև $MgCl_2$ -ի և NaF -ի ազդեցությունը այդ ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Կատարված ուսումնասիրությունները հնարավորություն են ընձեռել պարզելու տրիմետաֆոսֆատազայի մի քանի առանձնահատկություններ:

SEVERAL PROPERTIES OF INORGANIC TRIMETAPHOSPHATASE OF WHITE RAT AND HEN TISSUES

I. G. ASLANIAN, G. T. ADUNTS, A. A. GASPARIAN

The activity of trimetaphosphatase in homogenate and subcellular fractions of various tissues (liver, kidney, intestinal mucose, brain, heart, muscle) of rat and hen has been studied along with the influence of $MgCl_2$ and NaF on the activity of the enzyme. These experiments elucidate some peculiarities of trimetaphosphatase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кулаев И. С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль, Баховские чтения, 1975.
2. Perry S. W., Gray T. S. Biochem. 64, 185, 1956.
3. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови, М., 1953.

4. *Bodansky A. J. Biol. Chem. 101, 93, 1933.*
 5. *Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem. 162, 3421, 1946.*
 6. *Кулаев И. С., Крашенинников П. А., Афанасьева Т. П., Мансурова С. Э., Урысон С. О. ДАН СССР, 177, 229, 1965.*
 7. *Кулаев И. С., Мансурова С. Э., Афанасьева Т. П., Крашенинникова И. А., Холоденко В. П., Коношенко Г. И., Урысон С. О. В сб.: Докл. 14 Всесоюзного симпозиума по митохондриям, 15, М., 1968.*
-