

О НЕКОТОРЫХ ВОПРОСАХ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС

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

Под действием ультразвука щелочная фосфатаза почек белых крыс претерпевает существенные изменения. Активирование фермента происходит за счет образования активных радикалов, которые легко окисляют или восстанавливают вещества, связанные с его активным центром.

Вопросы регуляции щелочной фосфатазы затрагивались многими исследователями [1—5].

Наши предыдущие исследования на гомогенатах печени и почек белых крыс и кроликов [6], проведенные с использованием двух субстратов (пара-нитрофенилфосфат бария и β -глицерофосфат натрия), внесли определенную ясность в характер действия щелочной фосфатазы. Однако до настоящего времени нет ясного представления относительно изменения ее активности в срезах, гомогенатах и субклеточных фракциях при хранении.

Материал и методика. Опыты ставились на гомогенате, срезах, микросомальной и митохондриальной фракциях почек белых крыс в свежем состоянии и при хранении их в течение 24, 48, 72, 96 и 120 час. Активность щелочной фосфатазы с использованием субстрата β -глицерофосфата натрия (рН 9,6) определяли по методу Боданского [7], неорганический фосфор—по Лоури и Лопесу [8]. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося от субстрата фосфата на 1 г ткани за час инкубации. Колориметрировали при длине волны 630 мкм.

При использовании пара-нитрофенилфосфата (рН 10,5) ферментативную активность определяли по методу Шлыгина и Михлина [9]. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося фенола на 1 г ткани за 5 мин. Измерение производили при длине волны 420 мкм.

С целью выявления механизма активирования щелочной фосфатазы при хранении применяли ультразвук частотой 880 кГц, интенсивностью 5 Вт/см², при длительности воздействия 10 мин. Озвучивание проводилось в специальной термостатированной кювете, изготовленной нами, в которой поддерживалась постоянная температура (25°).

Результаты и обсуждение. Ранее полученные нами данные показали, что при хранении гомогената почек белых крыс в течение суток при температуре 4° активность щелочной фосфатазы значительно увеличивается [6]. Однако нам не удалось проникнуть в механизм активации фермента в этих условиях и найти пути регуляции этого процесса.

Нами было показано также, что под действием ультразвука активность щелочной фосфатазы в гомогенате и цельной ткани почек белых крыс резко возрастает [10]. Идентичность полученных результатов (при хранении в течение суток и озвучивании) привела к мысли об одновременном испытании этих двух факторов.

Поскольку щелочная фосфатаза в основном локализована в лизосомальной фракции, представлялось целесообразным для сравнения изучить также регуляцию активности фермента в полученных клеточных фракциях (митохондриях с лизосомами и микросомах).

Цельную ткань, гомогенат и клеточные фракции предварительно озвучивали, после чего хранили в течение 24, 48, 72, 96 и 120 час. при температуре 4°.

Приведенные рисунки показывают, что активность коркового слоя гомогената и цельной ткани почек белых крыс превалирует над таковой мозгового. По-видимому, это связано с неодинаковым распределением фермента в этих слоях почек. При хранении гомогенатов коркового и мозгового слоев в течение нескольких суток (рис. 1) наблюдает-

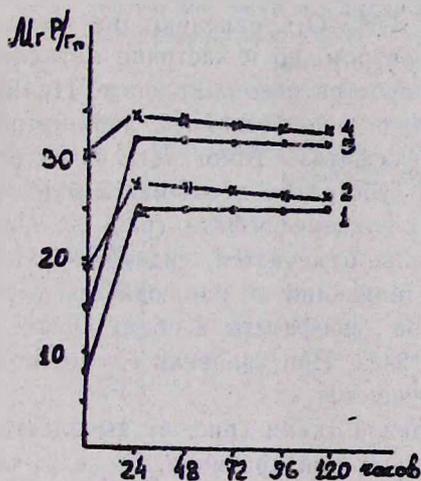


Рис. 1.

Рис. 1. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы гомогенатов мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат β -глицерофосфат натрия. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

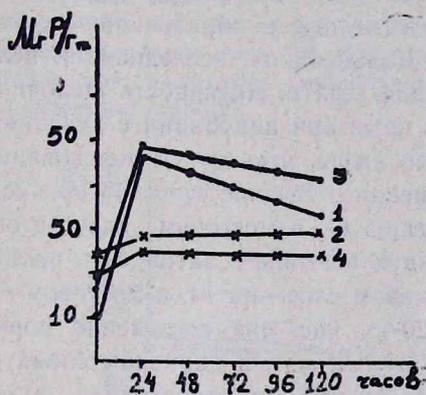


Рис. 2.

Рис. 2. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы цельной ткани мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат β -глицерофосфат-натрия. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

ся резкое увеличение активности щелочной фосфатазы лишь в первые 24 час. (на 210%—в мозговом слое, на 120%—в корковом), после чего она стабилизируется. Ультразвук увеличивает активность фермента свежего гомогената в обоих слоях в среднем на 120%, а при хранении его в течение суток изучаемый показатель в мозговом слое повышает-

ся еще на 28%, но при дальнейшем хранении он не претерпевает особых изменений. Как видно из рисунка, активность фермента в обоих гомогенатах под действием ультразвука одинакова, однако при хранении в мозговом слое она выше, чем в корковом на 90%. Такое повышение активности, вероятно, происходит за счет блокирования ряда связанных ингибиторов, которые имеются в достаточно большом количестве в мозговом слое.

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что процент активации при хранении тканей мозгового и коркового слоев составляет 340 и 300 соответственно, что намного превышает аналогичный показатель при хранении гомогенатов. Это можно объяснить высвобождением ингибиторов при гомогенизировании, что исключается в цельной ткани.

Ультразвук активирует щелочную фосфатазу цельной ткани коркового слоя в минимальной степени, а мозгового—на 125%, при хранении же тканей в течение 120-ти час. активность фермента не меняется. Фактически нарушение целостности ткани при гомогенизировании влечет за собой частичное разрушение веществ, связанных с активным центром изучаемого фермента. Под действием ультразвука в цельной ткани образовавшиеся радикалы (\dot{H} , $\text{OH}\dot{O}_2$) окисляют не только ингибиторы, связанные с активным центром, но и частично металлы, ответственные за образование фермент-субстратного комплекса [11, 12].

Дальнейшие исследования велись с использованием пара-нитрофенилфосфата. Активность щелочной фосфатазы гомогената почек белых крыс при инкубации с указанным субстратом в течение 5 мин гораздо выше, чем при использовании β -глицерофосфата (рис. 3). При хранении в течение суток в корковом слое отмечается тенденция к увеличению ее, в мозговом слое этой тенденции не наблюдается. Ультразвук повышает активность щелочной фосфатазы в обоих слоях: в корковом слое—на 14, в мозговом—на 24%. При хранении гомогенатов к 120-му час. она постепенно нормализуется.

В мозговом и корковом слоях цельной ткани (рис. 4) выявляется более низкая ферментативная активность при хранении, после 24-часового хранения в корковом слое она повышается (на 44%), а в мозговом остается на постоянном уровне. Ультразвук повышает активность фермента в обоих слоях почек белых крыс, в корковом слое на 21, мозговом—на 25%, затем при хранении в течение времени в мозговом слое она резко снижается, а в корковом остается постоянной.

На рис. 5, 6 приведены данные, касающиеся активности щелочной фосфатазы отдельных клеточных фракций при озвучивании и хранении с применением обоих субстратов. Оказалось, что озвучивание не влияет на ферментативную активность полученных фракций в норме и при хранении в течение 120-ти часов.

Таким образом, наиболее высокая активность щелочной фосфатазы при хранении отмечена в цельной ткани, в гомогенате она ниже, а в клеточных фракциях отсутствует. Выявленная закономерность под-

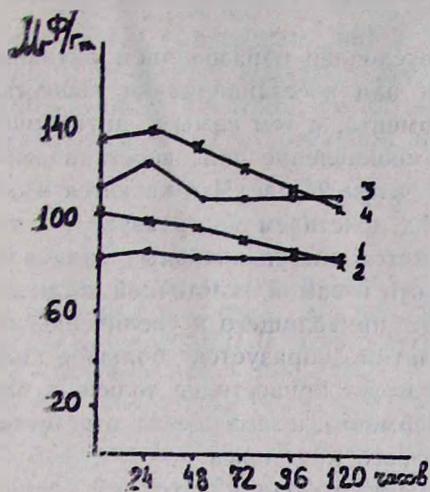


Рис. 3.

Рис. 3. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы гомогенатов мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

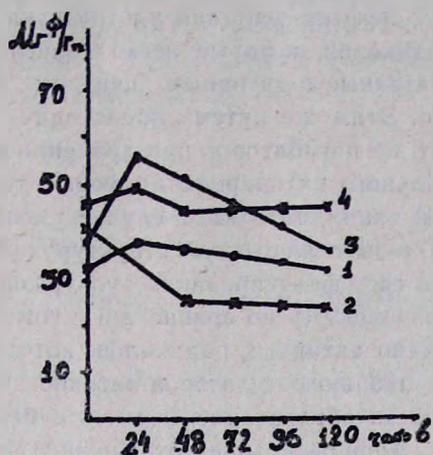


Рис. 4.

Рис. 4. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы цельной ткани мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

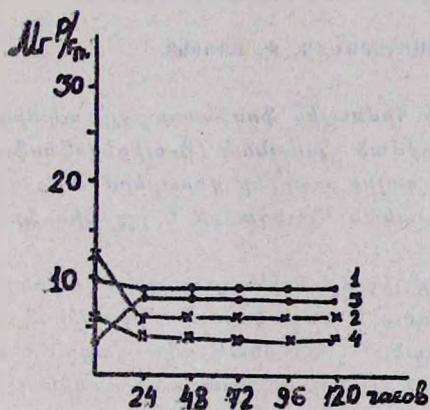


Рис. 5.

Рис. 5. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы субклеточных фракций почек белых крыс. Субстрат β -глицерофосфат натрия. 1—митохондрии, 2—митохондрии—УЗ, 3—микросомы, 4—микросомы—УЗ.

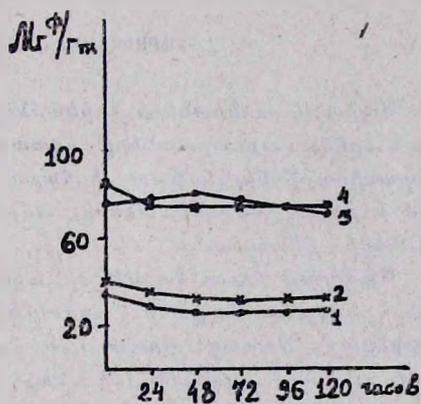


Рис. 6.

Рис. 6. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы субклеточных фракций почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—митохондрии, 2—митохондрии—УЗ, 3—микросомы, 4—микросомы—УЗ.

тверждает, что при нарушении целостности ткани эффект активации фермента резко снижается.

Эффект действия ультразвука обусловлен образованием активных радикалов, которые легко окисляют или восстанавливают вещества, связанные с активным центром фермента, и тем самым активируют его. Этим же путем происходит самоокисление или восстановление тех же ингибиторов при хранении в течение 24 час. Что касается минимального активирования фермента под действием ультразвука в цельной ткани, то в этом случае уменьшается доступ активных радикалов из воды в клеточную структуру, но зато в самой клеточной жидкости (за счет фокусирования ультразвука, приводящего к увеличению интенсивности) по сравнению с гомогенатом образуется большое количество активных радикалов, которые могут привести не только к блокированию регуляторов активности фермента, но и веществ, ответственных за образование фермент-субстратного комплекса.

Избирательное отношение фермента из одной и той же ткани к различным субстратам говорит о том, что активные центры его, ответственные за образование комплексов с этими двумя субстратами, по-видимому, отличаются в этом отношении друг от друга.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 22.II 1978 г.

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՐՈՇ ՀԱՐՑԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Վ. Ն. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Լ. Վ. ՍԱՐԿՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ

Սպիտակ առնետների երիկամների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության երկու սուբստրատների օգտագործման ժամանակ (β -գլիցերոֆոսֆատ, պարանիտրոֆենիլֆոսֆատ) ի հայտ է գալիս տարբեր վերաբերմունք՝ պահված և թարմ հոմոգենատների, ամբողջական հյուսվածքի և բջջային ֆրակցիաների նկատմամբ:

Պահելուց հետո ֆերմենտի ակտիվացումը ամենաբարձրն է ամբողջական հյուսվածքում, ցածր է հոմոգենատում և բացակայում է բջջային ֆրակցիաներում: Ճառագայթահարման ժամանակ ֆերմենտի ակտիվացումը տեղի է ունենում ուլտրաձայնի ներգործությունից առաջացած ռադիկալներով և ակտիվ կենտրոնի հետ կապված նյութերի փոխազդեցության հաշվին:

ON THE REGULATION OF RAT KIDNEY ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

V. O. BARSEGHIAN, L. V. SARKISSIAN, G. T. ADUNTS

It has been shown that in the case of using of two substrates a different pattern in the activities of alkaline phosphatase of rat kidney has been observed in the store and fresh homogenates of intact tissue and subcellular fractions.

The highest activity of the enzyme is presented in the intact tissue, lower in the homogenate, but it is not observed in the subcellular fractions. The enzyme activation takes place due to the formation of active radicals under the influence of ultra-sound. These radicals catalize the oxydation of the substances that are combined with its active centre.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Stein S. S., Koshland D. E.* Arch. Biochem. Biophys., 39, 229, 1952.
2. *Berthet F., De Duve C.* Biochem. J., 50, 174, 1951.
3. *Cohn M. J.* Biol. Chem., 201, 735, 1953.
4. *Kennedy F. S., Hill H. A. O., Kaden T. A., Vallee B. L.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 6, 1533, 1972.
5. *Ahters J.* Biochem. J., 141, 1, 257, 1974.
6. *Адуңц Г. Т., Саркисян Л. В.* Изв. АН АрмССР (биол. науки), 15, 7, 1962.
7. *Bodansky A. J.* Biol. Chem. 101, 93, 1933.
8. *Lowry O. H., Lopez J. A. J.* Biol. Chem., 162, 3, 421, 1946.
9. *Шлыгин Г. К., Михлин С. Я.* Вопросы мед. химии, 1, 461, 1955.
10. *Барсегян В. О., Адуңц Г. Т., Сарвазян А. П.* Уч. зап. ЕрГУ, 1, 1976.
11. *Anbar M., Pecht J.* Phys. Chem., 68, 352, 1964.
12. *Weissber A. J.* Acoust. Soc. Amer., 32, 283, 1960.