

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОЗГОВОЙ ТРИМЕТАФОСФАТАЗЫ

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

Изучалась активность неорганической триметафосфатазы в гомогенатах и субклеточных фракциях мозга крыс, кур и куриного эмбриона, а также действие некоторых металлов, металлсвязывающих реагентов и тиоловых соединений на ее активность.

Известно, что неорганические полифосфаты относятся к числу тех соединений, которые имеют важные биологические функции. Тот факт, что неорганические полифосфаты являются макроэргическими соединениями, при гидролизе каждой фосфоангидридной связи которых выделяется такое же количество энергии, как и при отщеплении терминального фосфата от АТФ, привлекает к ним пристальное внимание биохимиков. В настоящее время мы не имеем окончательного представления об этих соединениях и о ферментах, участвующих в их обмене в организме высших животных.

В предыдущем сообщении [1] нами было показано, что в различных тканях белых крыс и кур, а также куриного эмбриона [2] присутствует один из ферментов обмена неорганических полифосфатов—триметафосфатаза, специфически расщепляющая триметафосфат до ортофосфата. Мы изучали ряд свойств этого фермента.

Однако предметом внимания настоящей работы является нервная система, где осуществляются сложнейшие и высокоспециализированные функции мозга. Перспективным путем исследования закономерностей химизма нервной системы также является ее изучение в процессе онтогенеза.

Объектом наших исследований явился мозг крыс, кур и куриного эмбриона. Мы задались целью изучить некоторые особенности мозговой триметафосфатазы, используя ряд реагентов.

*Материал и методика.* Определение активности триметафосфатазы и кислой фосфатазы проводили методом Берга [3], неорганический фосфор—Лоури и Лопеса [4]. Гомогенат готовили на  $H_2O$  в соотношении 1:10 (в/об). В качестве субстрата использовали триметафосфат Na, а также  $\beta$ -глицерофосфат Na, приготовленные на мединаловом буфере pH-5. Инкубацию проводили в течение часа при 37°. Инкубационная смесь состояла (в мл): 1 гомогената; 2,5 субстрата; 0,5 испытуемого реагента (ПХМБ—парахлормеркурийбензоат, MIA—монойодацетат, цистенин, SII-глутатион  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M; орто-оксихинолдин, ЭДТА-этилендиаминтетрацетат, тиомочевина;  $FeSO_4$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2$   $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  M). Проводилась предварительная предынку-

бация с этими реагентами в течение 15 мин. Результаты выражали в мкмольх Р/г свежей ткани.

*Результаты и обсуждение.* Проведенные нами исследования показывают, что после диализа мозгового гомогената крыс против  $H_2O$  в течение 24 ч при постоянном вращении активность неорганической триметафосфатазы понижается, однако в храненном гомогенате (24 ч при  $4^\circ$ ) отмечается значительное повышение активности фермента (41 мкмоль—контроль, 62—храненный, 16—после диализа). При хранении гомогената в определенных условиях зачастую активность некоторых ферментов повышается. По-видимому, триметафосфатаза в клетке не использует всей своей каталитической мощи и при хранении на холоду проявляет потенциальную активность. В опытах, проводимых с кислой фосфатазой, не наблюдалось изменений в активности фермента после диализа, но незначительно повышалась ее активность после хранения на холоду. В первом случае сказывается, по-видимому, наличие низкомолекулярного фактора (стабилизатор, активатор), высвобождающегося при диализе. Таким низкомолекулярным фактором может быть ион металла. Однако проведенные нами эксперименты с металлсвязывающими соединениями (ЭДТА, орто-оксихинолин, тиомочевина) показали несостоятельность этого предположения (табл. 1). ЭДТА, орто-

Таблица 1

Влияние металлсвязывающих реагентов на триметафосфатазу и кислую фосфатазу мозга крыс, мкмоль Р/г свежей ткани

| Контроль            | $10^{-2}$ М       | $10^{-3}$ М       | $10^{-4}$ М       |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Триметафосфатаза    |                   |                   |                   |
| ЭДТА                |                   |                   |                   |
| 48±2,5<br>p>0,001   | 55±3,1<br>p>0,001 | 68±4,1<br>p>0,001 | 78±7,3<br>p<0,001 |
| Орто-оксихинолин    |                   |                   |                   |
| 74±4,9<br>p<0,001   | 83±6,1<br>p>0,001 | 77±5<br>p>0,001   | 83±6,8<br>p>0,001 |
| Тиомочевина         |                   |                   |                   |
| 64±4,7<br>p<0,001   | 72±3,1<br>p>0,001 | 72±3<br>p>0,001   | 79±2,9<br>p<0,001 |
| Кислая фосфатаза    |                   |                   |                   |
| ЭДТА                |                   |                   |                   |
| 24,4±1,8<br>p>0,01  | 33±3,3<br>p>0,01  | 30±3<br>p>0,01    | 25±2,7<br>p>0,025 |
| Орто-оксихинолин    |                   |                   |                   |
| 37,4±4,2<br>p>0,005 | 50±4,1<br>p>0,001 | 49±4,5<br>p>0,001 | 23±5<br>p=0,01    |
| Тиомочевина         |                   |                   |                   |
| 29±1,7<br>p=0,005   | 24±1,5<br>p>0,001 | 20±2,9<br>p>0,025 | 32±1<br>p>0,001   |

Количество опытов—6

Таблица 2

Изменение активности триметафосфатазы и кислой фосфатазы под влиянием некоторых металлов в мозговой ткани крыс, мкмоль Р/г свежей ткани

| Контроль            | $10^{-2}$ М       | $10^{-3}$ М       | $10^{-4}$ М       |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Триметафосфатаза    |                   |                   |                   |
| $CaCl_2$            |                   |                   |                   |
| 45±2,1<br>p>0,005   | 20±2,1<br>p>0,005 | 31±2<br>p>0,005   | 27±3<br>p<0,01    |
| $FeSO_4$            |                   |                   |                   |
| 49±3,8<br>p>0,005   | 17±2<br>p>0,05    | 20±2<br>p>0,05    | 35±2,1<br>p>0,005 |
| $ZnCl_2$            |                   |                   |                   |
| 39±2,2<br>p>0,001   | 17±3<br>p=0,025   | 23±4,5<br>p=0,005 | 40±3<br>p>0,005   |
| Кислая фосфатаза    |                   |                   |                   |
| $CaCl_2$            |                   |                   |                   |
| 28±1,9<br>p>0,05    | 20±2,2<br>p>0,1   | 17±1,3<br>p>0,005 | 21±3<br>p>0,05    |
| $FeSO_4$            |                   |                   |                   |
| 29±1,7<br>p=0,005   | 16±2,3<br>p>0,02  | 15±4,3<br>p<0,05  | 20±1,7<br>p>0,005 |
| $ZnCl_2$            |                   |                   |                   |
| 30,3±2,6<br>p>0,005 | 17±2,1<br>p>0,005 | 23±3<br>p>0,005   | 32±4,1<br>p>0,005 |

Количество опытов—6.

оксихинолин и тиомочевина во всех взятых концентрациях повышают активность триметафосфатазы. Что касается кислой фосфатазы, ЭДТА и тиомочевина не оказывают заметного воздействия на фермент, оксихинолин в концентрации  $10^{-2}$  и несколько в  $10^{-3}$  М повышают ее активность. По-видимому, использованные нами лиганды связывают металлы, ингибирующие активность триметафосфатазы, что приводит к повышению активности фермента. Основываясь на этом предположении, мы испробовали действие некоторых двухвалентных металлов  $Fe^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$  на активность триметафосфатазы. Как показали результаты наших исследований (табл. 2).  $Fe^{++}$  является сильным ингибитором триметафосфатазы, а ионы  $Ca^{++}$  и  $Zn^{++}$  — более слабыми, что совпадает с литературными данными о свойствах триметафосфатазы в кишечной слизи крыс [5].

Таблица 3

Влияние тиоловых соединений на мозговую триметафосфатазу крыс и кур, мкмоль Р/г свежей ткани

| Контроль          | $10^{-3}$ М         | $10^{-4}$ М       | $10^{-5}$ М       | Контроль        | $10^{-3}$ М         | $10^{-4}$ М         | $10^{-5}$ М         |
|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Крысы<br>ПХМ-Б    |                     |                   |                   | Куры<br>ПХМ-Б   |                     |                     |                     |
| 36±2,2<br>p>0,001 | 16,5±1,5<br>p>0,005 | 15±1,7<br>p<0,005 | 16±2<br>p<0,001   | 40±2<br>p>0,001 | 14,5±0,9<br>p<0,1   | 16,2±1<br>p>0,001   | 9,8±1,4<br>p>0,01   |
| МИА               |                     |                   |                   | МИА             |                     |                     |                     |
| 36±2,2<br>p>0,001 | 41±3,4<br>p>0,005   | 41±3,6<br>p>0,005 | 41±3,2<br>p>0,005 | 40±2<br>p>0,001 | 26,6±1,4<br>p>0,001 | 18,3±2,1<br>p<0,01  | 11,2±2,2<br>p>0,005 |
| Цистеин           |                     |                   |                   | Цистеин         |                     |                     |                     |
| 36±2,2<br>p>0,001 | 47±4<br>p>0,005     | 50±4,5<br>p>0,001 | 52±3,7<br>p>0,002 | 40±2<br>p>0,001 | 27,8±1,9<br>p>0,005 | 35,5±2,9<br>p>0,001 | 21±1,5<br>p>0,005   |
| Глутатион         |                     |                   |                   | Глутатион       |                     |                     |                     |
| 36±2,2<br>p>0,001 | 48±3<br>p>0,001     | 48±5<br>p>0,005   | 37±7<br>p>0,002   | 40±2<br>p>0,005 | 12±1,7<br>p>0,005   | 16,8±2,3<br>p>0,001 | 29,2±4<br>p>0,005   |

Количество опытов—6.

Известно, что SH-группы играют важную роль в деятельности ряда ферментов. Среди различных реагентов на SH-группы особо специфическими являются ПХМБ и МИА.

Нами было установлено (табл. 3), что в мозге крыс при добавлении в реакционную смесь ПХМБ, МИА, цистеина и SH-глутатиона наблюдается следующее: ПХМБ во всех трех концентрациях понижает активность триметафосфатазы, МИА заметных изменений не вызывает, цистеин, SH-глутатион повышают активность фермента. Преимущество алкилирующих и окисляющих реагентов по сравнению с ртутноорганическими в том, что они позволяют с большей легкостью дифференцировать различные типы SH-групп в белке и избирательно блокировать бо-



лее доступные или более реакционноспособные, оставляя нетронутыми менее доступные или менее реакционноспособные. Отсутствие эффекта при действии йодоацетатом, по-видимому, можно объяснить или связыванием ею несущественных для фермента SH-групп, или тем, что MIA в данном случае вообще не блокирует SH-группы ввиду их недоступности. Однако ПХМБ блокирует недоступные для алкилирования SH-группы, тем самым понижая активность фермента—триметафосфатазы. Иная картина наблюдается в мозге кур. ПХМБ, будучи жестким тиоловым реагентом, резко ингибирует активность триметафосфатазы; MIA, цистеин и SH-глутатион также понижают активность фермента. Такая разница в действии тиоловых реагентов на активность триметафосфатазы кур и кур свидетельствует о видовой специфичности фермента.

Известно, что торможение активности фермента под действием цистеина может происходить различными путями. Последний оказывает тормозящее действие на многие ферменты, которые активируются ионами металлов. Ряд авторов показали, что цистеин с металлами образует комплексы [6, 7]. То же можно сказать о SH-глутатионе. Возможно, и в наших экспериментах цистеин и глутатион связывают металл, необходимый для проявления активности мозговой триметафосфатазы кур, вследствие чего активность фермента падает.

Ткани развивающегося и растущего организма значительно отличаются от тканей взрослого как по химизму, так и по структуре и функциональным свойствам. ПХМБ в высоких концентрациях тормозит активность триметафосфатазы в течение развития куриного эмбриона. MIA, цистеин и глутатион не оказывают особого влияния на активность фермента (табл. 4).

Нами также установлена субклеточная локализация триметафосфатазы в мозге куриного эмбриона. Как показали результаты наших исследований, на 15, 16, 20, 21-й дни инкубации триметафосфатаза обнаруживается во фракции митохондрии и ядра. В цитоплазме не удалось установить активности фермента. Данные, полученные в экспериментах на курином эмбрионе, соответствуют полученным ранее в опытах со взрослыми курами [1].

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 12.II 1979 г.

## ՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՏՐԻՄԵՏԱՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Բ. Հ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԳՈՒՆՑ, Ա. Ա. ԳՍՊԱՐՅԱՆ

*Ուսումնասիրվել է անօրգանական տրիմետաֆոսֆատազայի ակտիվությունը առնետների, հավերի ու հավի սաղմի ուղեղային հոմոգենատներում և Լևիթաբջջային ֆրակցիաներում:*

*Ուսումնասիրվել է նաև մի շարք մետաղների, մետաղ կապող ռեագենտների և թիուրային միացությունների ազդեցությունը նրա ակտիվության վրա:*

# SOME PECULIARITIES OF RAT BRAIN TRIMETAPHOSPHATASE

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

The activity of trimetaphosphatase in rat brain homogenate and subcellular fractions has been studied as well as the influence of some metals, metalbounding reagents on the activity.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асланян И. Г., Адуни Г. Т., Гаспарян А. А. Биолог. ж. Армении, 31, 6, 1978.
2. Асланян И. Г., Адуни Г. Т., Гаспарян А. А. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 1979.
3. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953.
4. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 3421, 1946.
5. George G. Berg and L. Heicklen Gordon. J. Histochem. and cytochem., 8, 2, 1960.
6. Williams R. J. P. In The Enzymes, N. V., 1959.
7. Yudkin W. H., Fruton J. S. J. Biol. Chem, 169, 521, 1947.