

КАРБАМИЛФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

Р. Р. НЕРСЕСЯН, Г. Т. АДУНЦ

Исследовалась активность кислой фосфатазы, расщепляющей карбамилфосфат в разных субклеточных образованиях, выделенных из целого мозга крыс. Нанвысшая карбамилфосфатазная активность выявлена в микросомах, затем синапсосомах и митохондриях. Высокая активность карбамилфосфатазы в микросомах и синапсосомах подтверждает экстрализосомальную локализацию фермента.

Ключевые слова: карбамил- и ацетилфосфатазы, пара-хлормеркурибензоат натрия тартарат, микросомы, синапсосомы.

Карбамил- и ацетилфосфатазы были впервые выделены и описаны Липманом [16]. В литературе имеется ряд сообщений относительно активности карбамилфосфатазы в некоторых органах и тканях млекопитающих и рыб [10, 12, 15, 16]. Показано, что фермент гомогенен и имеет небольшой молекулярный вес [12]. Однако субцеллюлярная локализация карбамилфосфатазы в различных органах, в частности в нервной системе, а также воздействие разных активаторов и ингибиторов на ее активность изучены пока недостаточно. В связи с этим представляло интерес исследование активности этого фермента (КФ 3.1.3.2) в разных отделах и субклеточных образованиях мозга белых крыс в норме и под действием различных реагентов, что явилось целью настоящей работы.

Материал и методика. Исследования проводили на гомогенатах различных отделов головного мозга белых крыс (большие полушария, продолговатый мозг, мозжечок), а также на субклеточных частицах, изолированных из целого мозга.

Ткань гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы (1:10) и фракционировали путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы по схеме, описанной Манукян и сотр. [2], представляющей комбинацию нескольких методов, предложенных разными авторами [1, 7]. В качестве субстрата использовали карбамилфосфат (КФ) (Sigma chem. Co.). Инкубационная смесь содержала 0,08 М ацетатного буфера рН 5,0, 2—8 мМ карбамилфосфата, гомогенат, соответствующий 20—40 мг ткани, и в зависимости от условий опыта следующие реагенты: NaF^- — 10^{-2} М, виннокислый натрий— 10^{-3} М, Mg^{++} — 10^{-2} М, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)— 10^{-3} М, пара-хлормеркурибензоат (П-ХМБ)— 10^{-5} М. Общий объем реакционной смеси—1 мл. Реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 30%-ного ТХУ. Об активности фермента судили по приросту неорганического фосфата после 30-минутной инкубации при 30°. Неорганический фосфат определяли по методу Фиске-Суббароу [11], белок—по Лоури [17]. В одних случаях результаты опытов выражали в мкмольях фосфора на

грамм влажной массы мозга, а в других—удельную активность фермента вычислили в микролях образованного фосфора за 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. В различных отделах мозга (большие полушария, продолговатый мозг, мозжечок) белых крыс имеется довольно активная фосфатаза, которая расщепляет КФ в кислой зоне рН. Активность этого фермента в разных отделах мозга неодинакова и строго зависит от концентрации субстрата (рис).

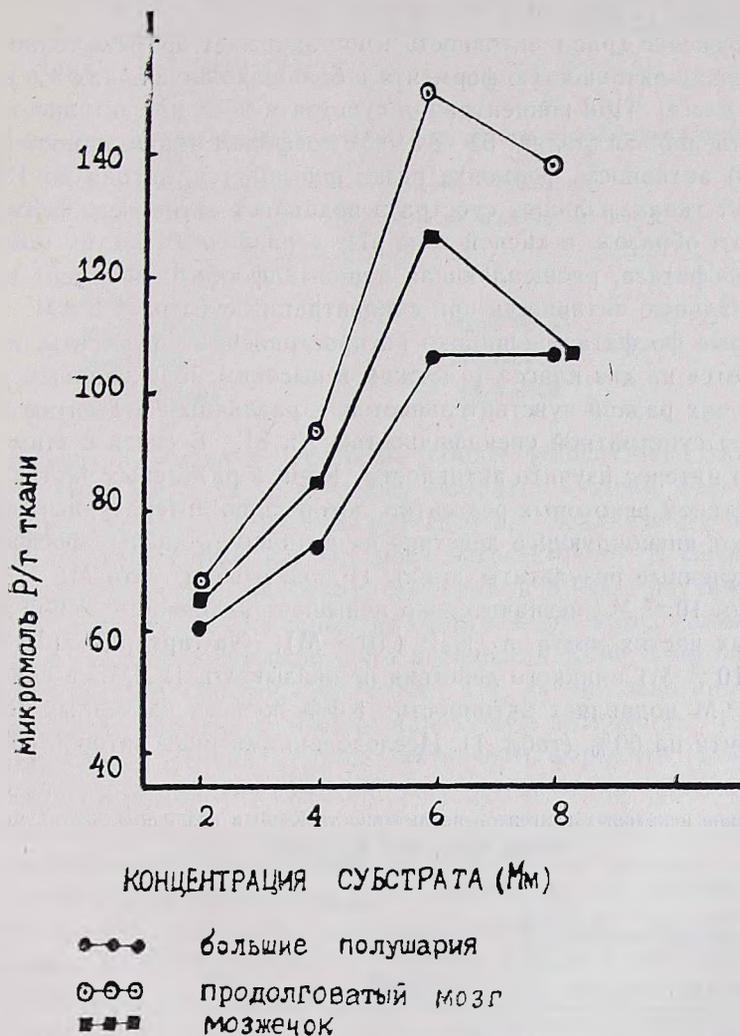


Рис. Изменение активности КФФ в различных отделах мозга в зависимости от концентрации субстрата (карбамил—фосфат).

Скорость ферментативной реакции во всех изученных отделах мозга возрастает при увеличении концентрации КФ в реакционной смеси от 2 до 6 мМ (рис).

В больших полушариях карбамилфосфат-фосфатаза (КФФ) выявляет значительную активность, которая при концентрации субстрата 2—6 мМ составляет 60—104 мкМ фосфора/г влажной ткани соответственно. При увеличении концентрации КФ до 8 мМ активность фермента не изменяется, оставаясь на том же высоком уровне.

Самая высокая активность КФФ отмечается в продолговатом мозге, где она составляет в зависимости от концентрации субстрата 72—148 мкМ фосфора/г ткани. При увеличении концентрации субстрата до 8 мМ активность фермента слегка ингибируется.

В мозжечке (рис.) активность КФФ занимает промежуточное положение между активностью фермента в больших полушариях и в продолговатом мозге. При концентрации субстрата 2—4 мМ активность КФФ соответственно составляет 65—84 мкМ фосфора/г ткани, при концентрации 6 мМ активность фермента резко повышается, доходя до 130 мкМ фосфора/г ткани, излишек субстрата подавляет активность фермента.

Таким образом, в кислой зоне рН в различных частях мозга действует фосфатаза, расщепляющая карбамилфосфат. Фермент выявляет оптимальную активность при концентрации субстрата 6 мМ.

Кислые фосфатазы—широко распространенные ферменты, которые разделяются на два класса (с низким и высоким молекулярным весом), обладающих разной чувствительностью к различным реагентам и отличающихся субстратной специфичностью [3, 8]. В связи с этим представляло интерес изучить активность КФФ в различных частях мозга под действием некоторых реагентов, которые, по литературным данным, оказывают ингибирующее действие на активность кислых фосфатаз.

Полученные результаты (табл. 1) показывают, что Mg^{++} в концентрации 10^{-2} М незначительно повышает активность КФФ во всех изученных частях мозга, а NaF (10^{-2} М), Na -тартарат (10^{-2} М) и ЭДТА (10^{-3} М) никакого действия не оказывают. П-ХМБ в концентрации 10^{-5} М подавляет активность КФФ во всех изученных отделах мозга почти на 50% (табл. 1). Исследованиями ряда авторов показано,

Таблица 1

Влияние некоторых реагентов на активность КФФ в различных частях мозга белых крыс, мкМ Р/г сырой ткани

Добавленные реагенты	Концентрация субстрата, 6 мМ ⁻		
	большие полушария	продолговатый мозг	мозжечок
Норма	104,7±2,58	144±2,9	132,5±3,0
Mg^{++} 10^{-2} М	120,0±4,5	164±2,9	146,0±2,4
NaF 10^{-2} М	103,0±2,4	144,5±3,1	130,5±2,7
Na тартарат 10^{-2} М	102,6±2,6	139±5,0	136,6±4,3
ЭДТА 10^{-3} М	103,4±3,5	141,5±4,6	132,6±4,6
П-ХМБ 10^{-5} М	77,3±2,9	81,3±2,2	71,6±0,9

что низкомолекулярные кислые фосфатазы ингибируются П-ХМБ и другими SH-реагентами [3, 8] и нечувствительны к ионам фтора и тартарата. Последние являются сильными ингибиторами высокомолекулярных кислых фосфатаз.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в мозге у белых крыс функционирует высокоактивная фосфатаза, расщепляющая КФ, которая, судя по эффекту вышеуказанных ингибиторов, вероятно, относится к низкомолекулярному классу кислых фосфатаз. Отличительной особенностью этого класса фосфатаз является также высокая субстратная специфичность к п-нитрофенилфосфату [6, 8], рибофлавинфосфату и 17 эстрадиол-3-фосфату [9].

Таблица 2

Активность КФФ в субклеточных частях целого мозга белых крыс

Концентрация субстрата 6 мМ	мкМ Р за мин/на мг белка
Ядро	—
Митохондрии	15,1 ± 0,33
Микросомы	140,1 ± 2,0
Синапсомы	45,4 ± 3,0

В литературе имеются некоторые данные относительно активности и свойств низкомолекулярных кислых фосфатаз в мозге животных [6, 21]. Однако, как уже отмечалось, субклеточная локализация этих ферментов в нервной системе изучена пока недостаточно. В связи с этим в следующей серии опытов изучали активность КФФ в различных субклеточных фракциях, выделенных из целого мозга крыс. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что активность КФФ в митохондриях составляет 15,1 мМ фосфора/мг белка, т. е. значительно ниже, чем в микросомах, где фермент проявляет наивысшую активность—140,1 мкМ фосфора/мг белка. В синапсоме активность фермента также достаточно высока и составляет 45,4 мкМ фосфора/мг белка. Как видно, по активности КФФ синапсомы занимают промежуточное положение между митохондриями и микросомами.

По данным ряда авторов, кислые фосфатазы локализованы в тканях, богатых ретикулоэндотелиальными элементами с высоким содержанием лизосом [4]. Гофман и Ди Питеро [14] показали, что имеются также экстрализосомальные кислые фосфатазы, которые ингибируются П-ХМБ и почти не реагируют на NaF^- . Они полагают, что эти низкомолекулярные фосфатазы являются отдельными ферментами, отличающимися от высокомолекулярных кислых фосфатаз по субстратной специфичности, и не образуются в результате деградации последних при разрыве лизосом.

Полученные нами данные о высокой активности КФФ в микросомальной фракции мозга крыс говорят о том, что активность КФФ свой-

стенна не только лизосомам, но и другим субклеточным структурам, где, по всей вероятности, они могут иметь отличную от лизосомальных ферментов функцию.

Имеются многочисленные данные о том, что микросомальная фракция богата кислыми гидролизами, которые обладают трансферазными свойствами [18, 19]. В печени у человека и у 20 видов животных [13] найдена карбамилфосфат-глюкозофосфотрансфераза, для которой КФ является донором фосфатных групп, обладающим очень высоким фосфорилирующим потенциалом. Этот фермент более активен, чем глюкокиназа, которая является регулятором фосфорилирования глюкозы [13].

Полученные нами данные о сравнительно высокой активности КФФ в синапсосомах также подтверждает экстрализосомальную локализацию фермента. В ряде работ показано [10, 12], что КФФ действует совместно с K^+ -зависимыми фосфатазами, а именно п-нитрофенилфосфатазой и ацетилфосфатазой, которые стимулируются ионами калия и являются частью энзиматического комплекса $Na^+ + K^+$ -зависимой АТФазы. Эти авторы считают, что КФ и п-нитрофенилфосфат гидролизуются одним и тем же ферментом. Оба субстрата разрушаются при нагревании до 50° .

В синапсосомальной фракции мозга имеются также фосфопротеинфосфатазы и протеинкиназа, зависящая от циклической АМФ, которые фосфорилируют белки мембран синапсосом [20, 22]. Можно думать, что обнаруженные нами КФФ микросомальной и синапсосомальной фракций мозга крыс, наряду с другими фосфатазами, играют определенную роль в некоторых звеньях метаболизма нервной ткани. По данным ряда авторов [5], в мозговой ткани отсутствуют процессы начального этапа синтеза мочевины, в том числе и КФ. Возможно, функция фермента, расщепляющего карбамилфосфат в мозговой ткани, связана не с циклом мочевины, а с какими-то другими обменными процессами.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 10.IX 1980 г.

ԿԱՐԲԱՄԻԼՖՈՍՖԱՏԱՏՉԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԳԼԵՈՒԴԵԳԻ ՏԱՐՔԵՐ ՄԱՍԵՐՈՒՄ

Ռ. Ռ. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ

Սպիտակ առնետների գլխուղեղի տարբեր մասերում գործում է բավական ակտիվ թթու ֆոսֆատազա, որը որպես սուբստրատ ճեղքում է կարբամիլֆոսֆատը: Ուսումնասիրվել է այդ ֆերմենտի ակտիվությունը սպիտակ առնետների գլխուղեղից անջատված ենթաբջջային առանձին գոյացություններում:

Պարզվել է, որ կարբամիլֆոսֆատազային ամենաբարձր ակտիվությունը օժտված է միկրոսոմալ ֆրակցիան, այնուհետև սինապտոսոմալ, ապա միայն միտոքոնդրիալ ֆրակցիան: Ֆերմենտի այդպիսի բարձր ակտիվության

առկայությունը գլխուղեղի միկրոսոմներում և սինապտոսոմներում խոսում է կարրամիլֆոսֆատազայի էքստրալիզոսոմալ լոկալիզացիայի մասին:

CARBAMILPHOSPHATASE ACTIVITY IN DIFFERENT PARTS OF WHITE RAT BRAIN

R. R. NERSESSIAN, G. T. ADUNTS

It is shown that in different parts of white rat brain there is an active acidic phosphatase which splits carbamilphosphate. Among different subcellular formations, isolated from the rat brain, microsomal fractions have the highest carbamilphosphatase activity, then come synaptosomes, and the activity of mitochondria is rather low.

The high activity of carbamilphosphatase in microsomes and synaptosomes confirms the extralysosomal localization of the enzyme.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кренис Е. М., Красильникова В. И., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченикаева Е. Ю., Чуриковская Е. В. Ж. эволюц. биохимии и физиол., 4, 211, 1968.
2. Манукян К. Г., Левонян К. М., Степанян А. А., Киракосян Л. Г., Казарян Т. И. Вopr. биохимии мозга, 12, 68, 1977.
3. Arajo P. S., Mies Y. and Murada O. Biochim. Biophys. Acta, 221, 452, 1976.
4. Bowers W. E., De Duve C. J. Cell. Biol., 32, 2, 333, 1976.
5. Buniatian H. Ch. and Davtian M. A. J. Neurochem., 13, 743, 1966.
6. Chaimovich H. and Nome F. Arch. Biochem. and Biophys., 139, 9, 1970.
7. De Robertis E., Pellegrino De Iraldi A., Rodriguez de Lorez Arnaiz G. and Salganocoff J. J. Neurochem., 9, 23, 1962.
8. Di Pitero D. L. and Zongerte S. J. Biochem., 242, 3391, 1967.
9. Di Pitero D. L., J. Biochem., 243, 1303, 1968.
10. Elwod O. T., Wallace W. H., Brown E. A. and Hart W. M. Analytical Biochem., 54, 40, 1975.
11. Fiske C. H. and Subbarow J. J. Biochem., 66, 375, 1925.
12. Guisolla S., Caravaeha J. J. Biochem. Biophys. Acta, 29, 432, 1958.
13. Herman J. L. and Nordlie R. C. Arch. Biochem. and Biophys., 152, 180, 1976.
14. Hoffman L. M. and Di Pitero D. L. Am. J. Obstet Gynecol., 114, 1087, 1972.
15. Ioshida H., Izumi F. and Nagai K. Biochem. Biophys. Acta, 120, 183, 1966.
16. Lipman F. Advances in Enzymology, 6, 231, 1916.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biochem., 193, 265, 1951.
18. Nordlie R. C., Arton W. J., Hanson T. L., Gilstorf J. R. and Horna R. N. J. Biochem., 243, 6, 1966.
19. Rafter G. W. J. Biochem., 235, 2, 475, 1960.
20. Reddington M. and Mehl E. J. Biochem. Biophys. Acta, 555, 2, 230, 1979.
21. Tanzaki M. M., Bittencourth H. and Chaimowich M. S. J. Biochem. Biophys. Acta, 485, 116, 1977.
22. Therien H. M. and Mushynski W. E. J. Biochem. Biophys. Acta, 585, 188, 1979.