

## ЛИТЕРАТУРА

1. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А., Сафарян В. М., Мовсесян С. Г. Биохимия, 45, 258—265, 1980.
2. Карабашян Л. В., Экизян Н. Г., Сафарян В. М., Мовсесян С. Г. Молекулярная биология, 14, 773—778, 1980.
3. Arnold H., Maier K. P. Biochim. et Biophys. Acta, 251, 133—140, 1971.
4. Gauper F. P., Markau K., Sund H. Eur. J. Biochem., 49, 555—563, 1974.
5. Olson J. A., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 197, 67—79, 1952.
6. Po-Yok Chee, Dahl J. I., and Fahien L. A. J. of Neurochem., 33, 53—60, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 577.152.547.963.2

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ПОЛИФОСФАТАЗ В МОЗГЕ БЕЛЫХ КРЫС

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

В сравнительном аспекте изучалась активность тримета-, тетрамета-, триполи-, пепти (субстрат  $p=40$  и  $p=308$ ) фосфатаз, а также кислой фосфатазы в мозге крыс под действием различных эффекторов, а также локализация, оптимум рН, термоустойчивость и стабильность этих ферментов. Предполагается, что неорганические полифосфатазы являются индивидуальными ферментами, играющими определенную роль в фосфорном и энергетическом обмене живых организмов.

*Ключевые слова:* полифосфатазы, чувствительность к эффекторам.

Неорганические полифосфаты в настоящее время выявлены у большинства низших и высших животных и растений, хотя у различных групп организмов их присутствие определено с разной степенью достоверности. Имеется много данных о превращениях неорганических полифосфатов в клетках живых организмов. Однако физиологическая роль этих фосфорных соединений до сих пор недостаточно ясна. Не исключено, что полифосфаты выполняют в жизнедеятельности организмов важные функции.

Изучение энзиматических реакций, осуществляющих превращения конденсированных неорганических полифосфатов, представляет несомненный интерес. Существует целый спектр ферментов, участвующих в обмене полифосфатов. Наличие разных путей распада внутриклеточных соединений, а следовательно, и разных ферментов, участвующих в этих процессах, позволяет более тонко регулировать скорость их течения в клетке, точно координируя ее со скоростью других, сопряженных с ним процессов. В этом отношении представляло несомненный интерес исследование в сравнительном аспекте свойств некоторых из ферментов обмена неорганических полифосфатов

*Материал и методика.* В опытах использовались самцы белых крыс массой 120—140 г. Ткани животных после декапитации извлекали и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера на холоду с разведением 1:10 или 1:5 (в/в). Активность триметафосфатазы, тетраметафосфатазы, триполифосфатазы и других полифосфатаз (I и II) (субстрат с длиной цепи  $n=40$  и  $n=308$ ) определяли методом Берга [4]; кислой фосфатазы—(субстрат  $\beta$ -глицерофосфат) методом Боданского [5]. Инкубационная смесь во всех случаях содержала 1 мл фракции или гомогената; 1,25 субстрата, приготовленного на медиаловом буфере (0,1 М) pH 5; 0,5 мл соответствующего эффектора (катионы, ортофосфат, тартрат). Реакцию останавливали после часовой инкубации при 37° 0,4 мл 40%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) на холоду.

Отдельные клеточные фракции получали методом дифференциального центрифугирования по схеме Перри и Грея [9].

Количество неорганического фосфата определяли методом Тауски и Шорра [10].

*Результаты и обсуждение.* В первой серии экспериментов нами определялась активность три- и тетраметафосфатаз, триполифосфатазы и полифосфатаз I и II, а также кислой фосфатазы в разных органах белых крыс (мозг, печень, мышца, сердечная мышца, слизистая тонких кишок, почки).

Как показали результаты наших исследований, активность триполифосфатазы тканей крыс значительно выше активности всех опробированных нами ферментов.

Особый интерес представляет изучение внутриклеточной локализации полифосфатаз, что может явиться ключом к пониманию той физиологической роли, которую играют эти важные ферменты в метаболизме неорганических полифосфатов. С этой целью нами в сравнительном аспекте изучалась активность этих ферментов в различных субклеточных фракциях мозга белых крыс. Установлена различная локализация их в клетках организма. Тот факт, что триполифосфатаза локализована если не исключительно, то в основном в митохондриях, по-видимому, свидетельствует о ее участии в фосфорном и энергетическом обмене. Не исключено, например, что она, подобно АТФ-азе [3], может играть существенную роль в транспорте ионов через мембрану митохондрий и в других энергозависимых процессах (табл.).

Таким образом, нами выявлена общая картина распределения некоторых полифосфатаз внутри клетки мозга крыс.

В следующей серии экспериментов производили температурную обработку гомогенатов мозга крыс при 60° в течение 10 мин, а также ультразвуковое озвучивание (22 кгц 4 мин), которое привело к переходу активности триметафосфатазы в цитоплазму. Последнее, очевидно, объясняется солиubilизацией из внутреннего пространства субклеточных частиц или возможной диссоциацией с высвобождением субъединицы фермента. Можно предположить также, что фермент, находящийся в адсорбированном состоянии на каких-либо мембранах (ретикулярных, митохондриальных), при подобной обработке гомогената переходит в раствор.

Данные о зависимости активности неорганических полифосфатаз от термообработки свидетельствуют о термостабильности три-, тетраметафосфатаз, триполифосфатазы и полифосфатаз I и II по сравнению с кислой фосфатазой. Термообработка или не понижает, или незначительно

Т а б л и ц а

Активность неорганических полифосфатаз в различных субклеточных фракциях мозга крыс, мкмоль Р/г ткани

Гомогенат	Цитоплазма	Митохондрии	Ядра
Триметафосфатаза			
25	0	6,9	20
Тетраметафосфатаза			
12,8	3,3	4,4	7,1
Триполифосфатаза			
56,5	10,6	30,2	11,5
Полифосфатаза I			
5,6	0	0	3,3
Кислая фосфатаза			
14	8	0	7,2

Количество опытов=6.

понижает активность ферментов. Наиболее термостабильна триметафосфатаза, кислая фосфатаза в этих условиях полностью теряет свою активность.

В последующих экспериментах нами определялась активность неорганических полифосфатаз в мозге крыс при разных значениях рН среды (4; 5; 6; 7; 8). Выяснилось, что наивысшая активность всех использованных ферментов проявляется в кислой зоне рН 4 или 5.

Ингибирование и активирование ферментов служит одним из факторов, регулирующих ход ферментативных реакций в клетке. Известно, что одним из наиболее эффективных ингибиторов кислой фосфатазы является тартарат [1]. Представляло интерес выяснить, какое действие оказывает тартарат на активность неорганических полифосфатаз.

Как показали наши исследования, разные полифосфатазы проявляют различную активность при добавлении тартарата ( $10^{-2}$  —  $10^{-4}$  М).

Известно, что фосфатазы различных тканей существенно отличаются друг от друга. Так, например, на фосфатазу эритроцитов тартарат не оказывает ингибирующего воздействия [1], тогда как в мозге наблюдалось полное ингибирование.

Так как концентрация ортофосфата в среде и в клетке является ключевым фактором регуляции ферментов фосфорного обмена, нами исследовалось влияние ортофосфата на активность неорганических полифосфатаз. Присутствие в инкубационной смеси неорганического фосфата в концентрации  $5 \cdot 10^{-2}$  М полностью ингибировало активность тримета-, триполи-, полифосфатазы I и кислой фосфатазы. Известно, что действие ортофосфата на полифосфатдеполимеразу из *N. crassa* носит сложный характер: высокие концентрации ее ингибируют фермент, а низкие, наоборот [2]. Нами установлено, что низкие концентрации субстрата ингибируют активность исследуемых полифосфатаз, а низкие концентрации ортофосфата ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) не оказывают влияния на триметафосфатазу и кислую фосфатазу и в два раза понижают активность полифосфатазы I.

В следующей серии экспериментов нами изучалось действие различных двухвалентных катионов ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{BaSO}_4$ ) на активность полифосфатаз в интервале концентраций от  $5 \cdot 10^{-3}$  —  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Как показали результаты исследований, почти все использованные катионы резко повышают активность полифосфатазы I, и только  $\text{BaSO}_4$  не оказывает воздействия на фермент. Ионы  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  понижают активность триполифосфатазы,  $\text{Ba}^{++}$  и  $\text{Ca}^{++}$  не оказывают заметного влияния на фермент.  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  понижают активность триметафосфатазы, тогда как  $\text{Mg}^{++}$  повышает ее активность. Что касается кислой фосфатазы, то ионы  $\text{Fe}^{++}$  и  $\text{Cu}^{++}$  понижают ее активность, остальные катионы никакого влияния не оказывают. Таким образом, двухвалентные катионы по-разному влияют на активность полифосфатаз (рис.). Однако все же неясен вопрос о

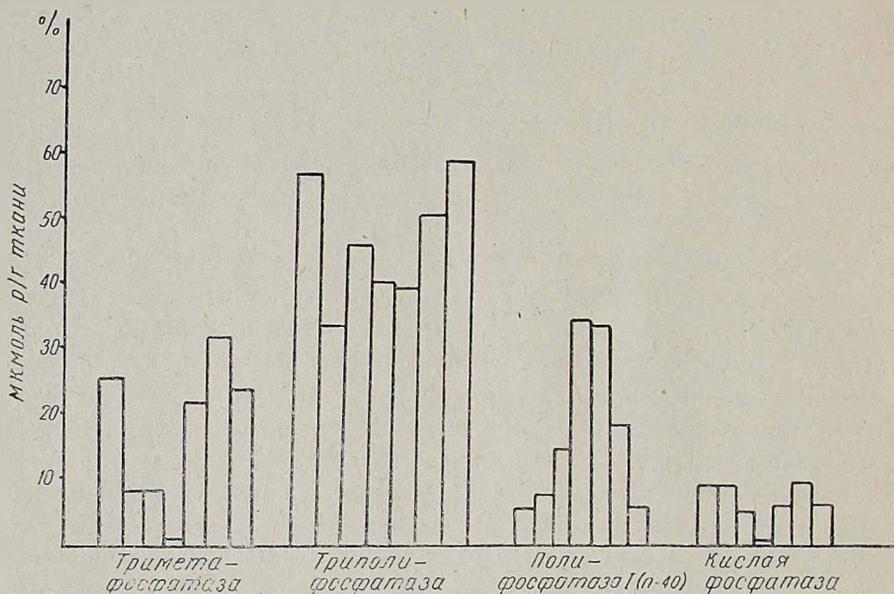


Рис. Влияние двухвалентных катионов на активность полифосфатаз.

- |  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| I. Триметафосфатаза, контроль, $\text{Cd}^{++}$ , $\text{Fe}^{++}$ , $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$ , $\text{Ba}^{++}$ . | II. Триполифосфатаза, контроль, $\text{Cd}^{++}$ , $\text{Fe}^{++}$ , $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$ , $\text{Ba}^{++}$ . | III. Полифосфатаза (I), контроль, $\text{Cd}^{++}$ , $\text{Fe}^{++}$ , $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$ , $\text{Ba}^{++}$ . | IV. Кислая фосфатаза, контроль, $\text{Cd}^{++}$ , $\text{Fe}^{++}$ , $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$ , $\text{Ba}^{++}$ . |
|--|---|---|---|

том, почему различные полифосфатазы по-разному реагируют на двухвалентные катионы. Вероятно, картина, наблюдаемая нами при действии того или иного катиона на активность разных полифосфатаз, осложнена тем, что воздействие эффектора направлено и на фермент, и на субстрат, а так как ферменты различаются (особенно в отношении сродства к тем или иным эффекторам) и нами используются разные субстраты, ингибирующий или активирующий эффект в присутствии в инкубационной среде того или иного иона может быть различным.

Таким образом, можно предположить, что неорганические полифосфатазы являются индивидуальными ферментами, по-видимому, имеющими определенное значение для фосфорного и энергетического обмена организма. Разная локализация в клетках мозга, изменение активности под влиянием добавленных эффекторов, вероятно, может зависеть от присутствия в клетках набора неорганических фосфатаз, специфически «настроенных» на разные фракции полифосфатов, отличающихся степенью полимерности.

Очевидно, что от того, какие полифосфатрасщепляющие ферменты находятся у данного организма в активном состоянии, зависит преобладание в нем тех или иных полифосфатных фракций. Именно с различием в наборе этих энзимов, по-видимому, связан тот факт, что у ряда организмов присутствует гамма конденсированных неорганических полифосфатов различной молекулярной массы—от высокомолекулярных до триполифосфата включительно [6—8].

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 27.V 1981 г.

## ՄԻ ՔԱՆԻ ՊՈԼԻՖՈՍՖԱՏԱԶԱՆԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂՈՒՄ

Բ. Գ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Գ. Տ. ԱԴՈՒՆՅ, Ա. Ա. ԴԱՍԳԱՐՅԱՆ

Համեմատական ասպեկտով ուսումնասիրվել է տրիմետա-, տետրամետա-, տրիպոլի-, պոլի (սուբստրատը  $n=40$  և  $n=308$ ) ֆոսֆատազայի ակտիվությունը, ինչպես նաև՝ թթու ֆոսֆատազայի ակտիվությունը առնետների ուղեղում՝ տարբեր գործոնների ազդեցությամբ:

Ուսումնասիրվել է նաև նրանց օպտիմալ pH-ը, թերմոդիմացկունությունը և կայունությունը:

Ենթադրվում է, որ անօրգանական պոլիֆոսֆատազաները հանդիսանում են ինդիվիդուալ ֆերմենտներ, որոնք որոշակի դեր են խաղում կենդանի օրգանիզմներում կներգիայի փոխանակման և ֆոսֆորացման պրոցեսներում:

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CERTAIN POLIPHOSPHATASES FROM WHITE RAT BRAIN

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

The activity of trimeta-, tetrameta-, tripoly-, poly- (substrate with  $n=40$  and  $n=308$ ) phosphatase and acid phosphatase, as well as their localisation, pH optima, heat stability and sensitivity to various effectors have been studied.

The inorganic phosphatases are proposed to be individual enzymes that play a definite role in the phosphorus metabolism.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адуңц Г. Т. Докт. дисс., Ереван, 1968.
2. Крицкий М. С., Чернышева Е. К., Кулаев И. С. Биохимия, 37, 983, 1972.
3. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.

4. Berg G. I. Cell Comparat. Physiol., 45/3, 435, 1955.
5. Bodansky P. J.B.C., 101, 93, 1933.
6. Langen P. und Liss E. Biochem. Z., 330, 455, 1958.
7. Langen P., Liss E. Naturwiss, 45, 101, 1958.
8. Langen P., Liss E. und Lohman K. In. book: Acides ribonucleiques et poliphosphates. Structure, Synthese et "Fonctions" cool Int. CNRS Strassburg., 106, 603, Ed. CNRS, Paris, 1962.
9. Perry S. W., Grey T. S. Biochem., 64, 185, 1956.
10. Tausscy H. H. Shor. JBC., 102, 675, 1953.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 616.981.452—078.7+599.323.4:591.69—931

## АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ К ФРАКЦИИ I ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ У ОБЫКНОВЕННЫХ ПОЛЕВОК ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ЗАРАЖЕНИИ

А. Е. СУВОРОВА, А. А. ВАРТАНЯН, М. Т. ШЕХИКЯН,  
А. Г. МНАЦАКАНЯН, В. В. ОГАНЕСЯН

Установлено, что выработка антител при внутрижелудочном заражении обыкновенных полевок происходит позже, чем при подкожном. При этом уровень титра антител ни в один срок исследования не достигал аналогичного показателя у полевок, зараженных подкожно.

*Ключевые слова:* антителообразование, обыкновенная полевка, чума

Основной путь циркуляции возбудителя чумы—грызун—блоха—грызун. Однако в условиях Закавказского высокогорного очага ряду исследователей удалось проследить алиментарное заражение полевок возбудителем чумы в результате каннибализма [4, 8]. Поэтому определенный интерес представило изучение антителообразования к фракции I возбудителя чумы у обыкновенных полевок при пероральном методе инфицирования. При этом следовало учесть, что в естественных условиях поедание больных чумой животных возможно как после длительного голодания полевок, так и без предварительного голодания, а активность ферментного содержимого желудочно-кишечного тракта в этих условиях будет различной. Известно, что голодание морских свинок и крольчат приводит к выраженному подъему щелочной фосфатазы кишечника в первые часы, затем уровень ее снижается и на относительно невысоких показателях держится в течение 15—20 часов [2].

Учитывая, что щелочная фосфатаза кишечника играет определенную роль в патогенезе кишечных инфекций [6, 7] и в проявлении патогенности вибрионов Эльтор и НАГ-вибрионов [3], мы попытались выяснить ее влияние на антителообразование к ф. I чумного микроба при пероральном заражении возбудителем чумы. При этом активизация щелочной фосфатазы кишечника у полевок осуществлялась подкожным введением раствора серноокислой магнeзии, так как в опытах на морских