

CHRONIC INFLUENCE OF MOLYBDENUM ON THE IMMUNOGENESIS AND BLOOD-CREATION SYSTEM OF RABBITS AND RATS

A. T. TER-AVETISIAN, M. A. VAROSIAN, A. A. PETROSIAN

Chronic intoxication of rats and rabbits by molybdenum Inhalation and hypodermic injections has brought to negative results, which are expressed in cells vital activity processes of the blood-creation and immunogenesis organs.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Израэльсон О. Я., Могилевская С. В., Суворов К. Л. В кн.: Вопросы гигиены труда и проф. патологии при работе с едкими металлами. М., 1973.
2. Ковальский В. Е., Яроеая Т. А. Природа, 6, 1966.
3. Каталымова М. В. Микроэлементы. М., 1962.
4. Школьник М. Я. Сб.: Микроэлементы в сельском хозяйстве и в медицине. Киев, 1963.
5. Testa N. J. Clin. Haemat., 8, 2, 311—333, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 9, 1983

УДК 577.15

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ГИСТИДИНА И СЕРИНА В ГОМОГЕНАТАХ ПОЧЕК И КИШОК НЕКОТОРЫХ ЖИВОТНЫХ

Г. Т. АДУНЦ, Л. В. САРКИСЯН

Активация щелочной фосфатазы кишок и почек крыс и кур осуществляется в основном под действием гистидина и серина. Гистидин и серин являются активаторами щелочной фосфатазы кишок крольчат, у взрослых особей подобного эффекта не наблюдается. Предполагается, что в аллостерических участках фермента в ходе онтогенеза происходят некоторые структурно-конформационные изменения, в результате чего фермент по отношению к гистидину и серину становится нечувствительным. Подобное явление имеет важное значение в регуляторной деятельности фермента.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, гистидин, серин.

Остатки серина и гистидина обнаружены в активных центрах многих щелочных и кислых фосфатаз [5]. Эти ферменты осуществляют гидролиз фосфорных эфиров с отщеплением фосфорной группы. По аналогии с серин-гистидиновыми ферментами кислотно-основных процессов обычно предполагают, что в неспецифических фосфатазах при образовании промежуточного продукта осуществляется фосфорилирование фермента по серину с участием гистидина, действующего по механизму обобщенного катализа [3].

Изучение влияния комплексообразующих аминокислот (гистидина, цистеина) на активность очищенной щелочной фосфатазы показало не-

посредственное участие их в образовании комплексов ионов металлов с белками [2]. Выявленные в опытах на очищенном ферменте закономерности не относятся к сложным системам (гомогенатам), поэтому нами были предприняты опыты по изучению влияния гистидина и серина на гомогенаты почек и кишок некоторых животных, стоящих на разных ступенях эволюционного развития.

Материал и методика. Опыты ставили на гомогенатах кишок и почек взрослых белых крыс массой 100—120 г, взрослых кур и кроликов, 5-дневных крысят, 4-дневных крольчат, 6- и 45-дневных цыплят. Активность щелочной фосфатазы регистрировали на ФЭК-М. Субстратом служил пара-нитрофенилфосфат в медиальном буфере, pH 9,6. Об активности фермента судили по нарастанию количества пара-нитрофенола в течение 10 мин при 30°. Интенсивность окраски фотометрировали при длине волны 420 нм [4]. Гистидин и серин использовали в концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ — 10^{-4} М; применяли частичную термоинактивацию гомогената при 40, 50, 60, 70, 80°. В таблицах приведены средние данные 6-ти опытов.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было установлено, что частичная термоинактивация очищенной щелочной фосфатазы кишок цыплят (фирма «Реанал», ВНР) при 45°, 50° приводит к незначительному активированию фермента, а при 65°—к полной потере биологической функции [1]. Аналогичные опыты, проведенные на гомогенате кишок 6-дневных цыплят, показали ступенчатое понижение активности щелочной фосфатазы при 40, 50, 60, 70 и 80°. Интересен факт сохранения определенной части каталитической активности фермента при 80° (17%).

Гистидин в концентрации 10^{-3} М резко активизирует фермент как в норме, так и при частичной термоинактивации гомогената при температуре от 40° до 80°, достигая при 70° максимума, составляющего 56% против 35% в норме. При сравнении данных, полученных на очищенном ферменте, с результатами настоящего исследования можно судить о термолабильности очищенного фермента

Таблица 1

Действие гистидина на активность щелочной фосфатазы кишок цыплят при частичной термоинактивации, мг фенола/г сырой ткани

6-дневные цыплята						
Норма	без термообработки	термообработка				
		40°	50°	60°	70°	80°
	11,5	9,5	9,8	9,0	4,0	2,0
%	100	82	82	78	35	17
Гистидин	38	37	36,5	35,5	21,5	5,0
%	100	96	94	93	56	13
P/P ⁰	330	390	382	394	537	250

В основе этого процесса лежат не химические, а физико-химические изменения: конформация молекулы фермента меняется, теряя водородные связи с переходом сульфгидрильных групп в дисульфидные.

Следующим этапом наших исследований было сравнение данных, полученных в опытах на 6- и 45-дневных цыплятах и взрослых курах (табл. 2). Согласно табл. 2, наивысшей активностью щелочной фосфа-

Таблица 2

Действие гистидина и серина на активность щелочной фосфатазы кишок и почек взрослых кур, 45- и 6-дневных цыплят, мг фенола/г сырой ткани

Киш ки					
	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые куры	2,0	1,5	5,5	3,25	2,0
45-дневные цыплята	6,5	3,0	14,5	7,0	6,5
6-дневные цыплята	13,0	6,0	33,0	26,0	20,5
	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые куры	2,0	2,0	5,0	2,0	2,0
45-дневные цыплята	7,0	3,0	13,5	7,5	7,0
6-дневные цыплята	13,0	10,5	28,5	24,0	16,5
П оч ки					
	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые куры	1,0	2,5	3,25	2,0	1,0
45-дневные цыплята	6,0	11,5	6,6	6,0	6,0
6-дневные цыплята	6,5	11,0	14,5	8,5	6,8
	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые куры	1,0	4,0	4,0	1,5	1,0
45-дневные цыплята	5,5	18,25	12,0	6,0	5,5
6-дневные цыплята	7,5	15,0	15,0	10,0	7,5

тазы обладают кишки и несколько меньшей—почки 6-дневных цыплят. С возрастом (у 45-дневных цыплят) она заметно снижается и доходит до минимума у взрослых кур. Под воздействием гистидина и серина в кишечной ткани взрослых кур и цыплят пики активации отмечаются при концентрации 10^{-3} М, в почечной ткани—только у 6-дневных цыплят. В почках взрослых кур и 45-дневных цыплят активация происходит при концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. С уменьшением ее активирующее действие на фермент ослабевает, а при концентрации 10^{-4} М вовсе отсутствует (исключение составляют кишки 6-дневных цыплят).

В табл. 3 приведены данные о влиянии гистидина и серина на активность щелочной фосфатазы кишок и почек взрослых кроликов и 4-дневных крольчат.

Таблица 3

Действие гистидина и серина на активность щелочной фосфатазы кишок и почек взрослых кроликов и 4-дневных крольчат, мг фенола/г сырой ткани

Киш ки					
	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые кролики	1,1	1,9	1,1	1,0	1,0
4-дневные крольчата	16,0	26,0	18,0	18,0	18,0
	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые кролики	1,1	1,7	1,3	1,3	1,3
4-дневные крольчата	17,0	26,0	17,0	17,0	17,0
Почки					
	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые кролики	37,0	52,0	41,0	41,0	41,0
4-дневные крольчата	6,0	10,0	6,5	6,0	6,0
	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые кролики	37,0	52,0	37,0	37,0	37,0
4-дневные крольчата	6,5	10,0	6,5	6,5	6,5

Установлено, что в норме высокой ферментативной активностью обладают кишки 4-дневных крольчат и почки взрослых кроликов. При действии гистидина и серина при активации отмечается при концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М, при остальных концентрациях особых изменений не наблюдается.

Опыты, проведенные на кишках и почках взрослых белых крыс и 5-дневных крысят (табл. 4), показали, что у взрослых крыс в норме активность фермента гораздо выше, чем у 5-дневных крысят. Почки взрослых крыс обладают более высокой активностью щелочной фосфатазы, чем кишки.

Использованные концентрации гистидина и серина оказывают активирующее действие на фермент кишок и почек взрослых крыс, за исклю-

Действие гистидина и серина на активность щелочной фосфатазы кишок и почек взрослых крыс и 5-дневных крысят, мг фенола/г сырой ткани.

К и ш к и

	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые крысы	5,0	26,0	12,5	7,0	5,0
5-дневные крысят	0,3	1,8	0,5	0,3	0,3

	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые крысы	6,0	32,75	19,0	10,0	6,5
5-дневные крысят	0,5	1,6	0,5	0,5	0,5

П о ч к и

	норма	Гистидин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые крысы	12,5	16,25	29,75	22,0	15,0
5-дневные крысят	1,5	5,5	1,75	1,75	1,75

	норма	Серин в концентрациях, М			
		$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}
Взрослые крысы	11,0	26,0	26,5	19,0	14,0
5-дневные крысят	1,5	4,3	1,5	1,5	1,5

чением гистидина в концентрации 10^{-4} М, который не влияет на ферментативную активность кишок. У 5-дневных крысят в изучаемых тканях активирование фермента отмечается только при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Привлекают внимание данные табл. 3, касающиеся активности щелочной фосфатазы кишок взрослых кроликов и крольчат под действием гистидина и серина. Эти аминокислоты ($5 \cdot 10^{-3}$ М), являясь активаторами щелочной фосфатазы кишок крольчат, на взрослых особей подобного влияния не оказывают. По-видимому, в ходе онтогенеза в молекуле фермента, а именно в его аллостерических участках, происходят некоторые структурно-конформационные изменения, в результате чего фермент по отношению к гистидину и серину становится нечувствительным. Это имеет важное значение в регуляторной деятельности фермента. Та же закономерность выявляется в почечной ткани.

Гистидин подавляет ингибирующий эффект термоденатурации фермента избирательно. Вероятно, он действует как аллостерический реагент, изменяя пространственную структуру фермента и частично предохраняет фермент от денатурации.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 11.II 1983 г.

ՀԻՄԵԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՆՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԻՍՏԻԴԻՆԻ ԵՎ ՍԵՐԻՆԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՆԵՐԻՑ ՄԻ ՔԱՆԻ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՐԱՆԵՐԻ ԵՎ ԱՂԻՆԵՐԻ ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՆԵՐՈՒՄ

Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Լ. Վ. ՍԱՐԿԻՍՅԱՆ

Առնետների և հավերի աղիների և երիկամների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվացումն իրականանում է հիմնականում հիստիդինի և սերինի ազդեցության տակ ($5 \cdot 10^{-3}$ և 10^{-3} կոնցենտրացիաներում): Եթե հիստիդինը և սերինը ($5 \cdot 10^{-3}$) հանդիսանում են նորածին ճագարների աղիների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվատորներ, ապա հասուն ճագարների մոտ նման երևույթ չի նկատվում: Հնարավոր է, որ կենդանիների անհատական զարգացման ընթացքում ֆերմենտի ալլոստերիկ հատվածներում տեղի են ունենում որոշ կառուցվածքային կոնֆորմացիոն փոփոխություններ, որի հետևանքով ֆերմենտը կորցնում է իր զգայունությունը հիստիդինի և սերինի նկատմամբ: Նման երևույթը կարևոր նշանակություն ունի ֆերմենտի կարգավորիչ գործունեության համար:

DEPENDENCE OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY UPON HISTIDINE AND SERINE CONCENTRATIONS IN HOMOGENATES OF KIDNEYS AND INTESTINES OF SOME ANIMALS

G. T. ADUNTZ, L. V. SARKISSIAN

The activation of intestinal and renal alkaline phosphatase of rats and hens is realized under the influence of histidine and serine (in $5 \cdot 10^{-3}$ and 10^{-3} M concentrations). The same effect is noted on the mentioned tissues of young rabbits, whereas serine and histidine have no influence on the activity of alkaline phosphatase of the adult ones. Some structural-conformational changes in allosteric sites of the enzyme are supposed during ontogenesis, which leads to the loss of enzyme sensitivity to histidine and serine. Such phenomenon is important for the regulating activity of the enzyme.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т., Саркисян Л. В., Барсегян В. О. Биолог. ж. Армении, 34, 2, 155, 1981.
2. Малер Г., Кордес Ю. Основы биол. химии. 24, М., 1970.
3. Полтораки М. О., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. 172, М., 1971.
4. Шлыгин Г. К., Михлин С. Я. Вopr. биох., 1, 461, 1955.
5. Falt G. H., Vallee B. L. Proc. Nat. Acad., Sci., USA, 56, 124, 1966.