КИСЛЫЕ ФОСФАТАЗЫ И НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Р. Р. НЕРСЕСЯН, Г. Т. АДУНИ

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Исследовали активность кислой фосфатазы в субклеточных образованиях, выделенных из целого мозга крысы. Показано, что в зависимости от локализации, они различаются по своим максимальным активностям и некоторым свойствам.

Высокая активность кислой фосфатазы в отношении карбамил-, ацетилфосфатов в микросомах и синантосомах мозга подтверждает экстрализосомальную локализацию фермента.

Անոտացիա — Ուսումնասիրվել է Թթու ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ասեմտի գլխուղեղից անջատված բջի տարրեր զոյացութ. թյուններում:

Յույց է տրվել, որ կախված տեղակայումից, նրանք տարբերվում են իրենց առաջնայություն ակտիվություններով և որոշ հատկություններով:

Թթու ֆոսֆատազայի բարձր ակտիվությունը կարբամիլ-, ացետիլֆոսֆատների նկատմամբ ուղեղի միկրոսոմներում և սինապտոսոմներում ապացուցում է ն ֆերմենտի էքստրալիզոսոմալ տեղակայումը:

Abstract — Activity of acidic phosphatase in subcellular particles, isolated from rat brain, has been studied.

It has been shown that in dependence on their localization they differ in their maximum activity and some properties.

High activity of acidic phosphatase with reference to carbamyl-, acetylphosphates in brain microsomes and synaptosomes confirm extralysosomal localization of this enzyme.

Ключевые слова: мозг, субклеточные образования, карбамил-, ацетилфосфатаза, неорганическая пирофосфатаза.

Кислые фосфатазы (КФ 3.1.3.2) являются ферментами с низкой субстратной специфичностью, которые гидролизуют однозамещенные сложные эфиры ортофосфата. Установлено, что они отличаются друг от друга рядом физико-химических свойств [5, 15]. Физиологическое значение некоторых форм этих ферментов пока неизвестно. Хотя кислые фосфатазы относятся к группе гидролаз, они также катализируют реакции трансфосфорилирования, играющие, как известно, важную роль во многих биохимических процессах.

В настоящем сообщении приводятся результаты сравнительного исследования некоторых форм кислых фосфатаз в субклеточных образованиях мозга белых крыс.

Материал и методика. Исследования проводили на субклеточных частях, выделенных из головного мозга белых крыс. Ткань гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы (1:10), фракционировали путем центрифугирования в градиенте плотностей сахарозы по схеме, описанной Манукян и сотр. [1].

Активность феилфосфатазы определяли по методу Брая и Торне [5]. Реакционная смесь содержала 0,1 М ацетатный буфер, pH 5,0; 50 мМ феилфосфат-натриевой соли (Sigma Chem. Co), исследуемые субклеточные фракции в количестве, соответствующем 20–40 мг исходной массы ткани. Реакцию останавливали дроблением

2 мл раствора Фолли-Чикалтеу. Удельную активность фермента вычисляли в микролях образованного фенола за 1 мин на мг белка. Для других кислых фосфатаз в качестве субстрата использовали карбамилфосфатдипитиевую (Sigma Chem. Co), ацетилфосфат-К-литиевую соль (Sigma Chem. Co) и пирофосфат (отечественного производства). Инкубационная смесь содержала: 0,08 М ацетатный буфер (рН 5,0), в зависимости от определяемой фосфатазы—6,0 мМ карбамилфосфата или 2,0 мМ ацетилфосфата, или 6,0 мМ пирофосфата (для неорганической пирофосфатазы) и исследуемые субклеточные фракции в количестве, соответствующем 20—40 мг исходной массы ткани. К пробам, в зависимости от условий опыта, добавляли также следующие реагенты: Mg^{2+} — 10^{-2} М, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)— 10^{-3} М. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл. Реакцию останавливали добавлением 30% трихлоруксусной кислоты. Об активности ферментов судили по приросту неорганического фосфата после 30-минутной инкубации при 37°. Неорганический фосфат определяли по Лоури-Нолесу [9], белок—по Лоури [10]. Удельную активность фермента вычисляли в микролях образованного фосфата за 1 мин на мг белка.

Результаты и обсуждение. Результаты определения активности изученных кислых фосфатаз в различных субклеточных образованиях мозга приведены в таблице. Видно, что активность кислой фенилфосфатазы проявлялась во всех исследованных субклеточных образованиях. Наиболее высокой она была в микросомах—75,5 мкМ фенола/мг белка, значительно ниже в митохондриях—3,8 мкМ фенола/мг белка и особенно низкой в синаптосомах—1,13 мкМ фенола/мг белка. Ионы магния, а также ЭДТА не влияли на активность митохондриального и синапсомембранного фермента, но активировали микросомальный фермент.

Ранее нами было показано, что в мозге белых крыс функционирует высокоактивная фосфатаза, расщепляющая карбамилфосфат и относящаяся к классу низкомолекулярных фосфатаз. Данные настоящего исследования показали, что активность карбамилфосфатазы в митохондриях довольно высокая—15,5 мкМ P/мг белка, но значительно ниже, чем в микросомальной фракции, где она проявляет наивысшую активность—141,1 мкМ P/мг белка. Синаптосомы занимают промежуточное положение. В митохондриальной и синапсомембранной фракциях мозга Mg^{2+} и ЭДТА никакого влияния на активность карбамилфосфатазы не оказывают. Только микросомальный фермент несколько стимулируется ионами магния.

В таблице представлены данные об активности еще одной кислой фосфатазы, субстратом для которой служит ацетилфосфат. Наиболее высокой активностью фермента обладает микросомальная фракция—120 мкМ P/мг белка, хотя в митохондриях и синаптосомах он достаточно высокоактивен—41,1 и 24,0 мкМ P/мг белка соответственно. Mg^{2+} стимулирует активность микросомального фермента, тогда как ЭДТА и совместное добавление ЭДТА и Mg^{2+} не оказывают никакого влияния.

Изучение механизмов превращений фосфорных эфиров и родственных им соединений представляет значительный интерес. Многочисленные представители этих соединений являются, с одной стороны, элементами биологических структур, с другой—промежуточными продуктами обмена. К последним относится пирофосфат, образующийся во всех субклеточных образованиях органов и тканей живых организмов. Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1), расщепляющая пирофосфат,

Субклеточные частицы	Фенилфосфодинатриевая соль, мкМ фенол/мг белка			
	норма	Mg ⁺⁺	Mg ⁺⁺ - ЭДТА	ЭДТА
Митохондрии	3.8±0.16	3.88±1.16	3.84±0.18	3.8±0.16
Микросомы	75.0±1.80	89.80±1.37 P<0.001	99.00±1.40 P<0.001	85.0±1.30 P<0.01
Синапсомы	1.13±0.14	1.14±0.2	1.13±0.11	1.13±1.15
Карбамилфосфат, мкМ P/мг белка				
Митохондрии	15.1±0.33	15.16±0.28	15.14±0.35	15.1±0.33
Микросомы	140.1±2.00	158.10±1.60 P<0.001	150.1±1.8 P<0.01	140.6±2.20
Синапсомы	45.0±3.0	45.4±3.10	45.2±3.0	45.0±3.1
Ацетилфосфат, мкМ P/мг белка				
Митохондрии	41.2±2.3	45.5±2.9 P<0.5	41.0±2.0	41.1±2.34
Микросомы	120.3±1.5	131.9±2.4 P<0.01	129.0±2.6 P<0.01	120.6±2.0
Синапсомы	24.0±0.56	26.0±0.82 P<0.1	26.8±1.4 P<0.1	24.0±1.8
Неорганический пирофосфат, мкМ P/мг белка				
Митохондрии	19.3±1.2	20.4±1.6	41.2±2.1 P<0.001	19.3±1.2
Микросомы	16.0±1.9	16.3±0.9	16.2±1.2	16.3±0.88
Синапсомы	0.97±0.17	1.1±0.11 P>0.5	1.16±0.12 P>0.5	0.97±0.07

играет важную роль в метаболических процессах и предотвращает его накопление, регулируя интенсивность этих реакций.

Изучение активности неорганической пирофосфатазы в различных субклеточных образованиях головного мозга белых крыс при кислом значении pH показало, что наиболее высокую активность фермент проявляет в митохондриальной фракции мозга—19,3 мкМ P/мг белка. Ионы магния не повышают активности митохондриального фермента, а совместное добавление Mg⁺⁺ и ЭДТА приводит к удваиванию ее—44,2 мкМ P/мг белка. В микросомах она ниже, чем в митохондриях, 16,3 мкМ P/мг белка. Но особенно низка активность фермента в синапсоме, 0,97 мкМ P/мг белка. Mg⁺⁺ с ЭДТА никакого воздействия на активность микросомального и синапсомального ферментов не оказывают.

В литературе имеются данные о том, что в печени крыс неорганическая пирофосфатаза преимущественно сосредоточена в митохондриях, где фермент имеет мембранную локализацию и участвует в синтезе АТФ [8].

По данным ряда авторов, кислые фосфатазы локализованы в тканях, богатых ретикулоэндотелиальными элементами с высоким содержанием лизосом [4]. Однако результаты наших исследований показали, что в различных субклеточных образованиях мозга белых крыс в кислой зоне pH действуют кислые фосфатазы, расщепляющие различ-

ные фосфорные эфиры. Эти ферменты, судя по внутриклеточной локализации и эффектам специфических ингибиторов и активаторов, по всей вероятности, относятся к различным классам кислых фосфатаз [2]: высокомолекулярным и низкомолекулярным. Последние отличаются друг от друга субстратной специфичностью и различной чувствительностью к эффекторам [19]. Полученные нами данные о высокой активности кислой фосфатазы в микросомальной фракции мозга говорят о том, что этот фермент активен не только в лизосомах, но и в других субклеточных структурах, где, по всей вероятности, может иметь отличную от лизосомальных фосфатаз функцию. Сравнительно высокая активность кислой фосфатазы по отношению к карбамил- и ацетилфосфатам в синапсосомах также подтверждает экстрализосомальную локализацию фермента.

В ряде работ показано [15], что карбамилфосфатаза действует совместно с K^+ -зависимыми фосфатазами, *p*-нитрофенилфосфатазой и ацетилфосфатазой, которые стимулируются ионами калия и являются частью энзиматического комплекса Na^+ , K^+ -зависимой АТФазы.

Известно, что исследованные нами субстраты и соответствующие ферменты участвуют в гидролазной и трансферазной реакциях в микросомальной фракции. Карбамилфосфатаза и неорганическая пирофосфатаза гидролизуют глюкозо-6-фосфат [7], но являются разными фосфогидролазами. В микросомальной фракции карбамилфосфат ингибирует пирофосфат-фосфогидролазную активность, а в митохондриальной фракции этого не наблюдается.

Проведенные нами исследования показали, что кислая неорганическая пирофосфатаза высокоактивна в митохондриальной фракции мозга. Митохондриальный фермент активируется Mg^{++} . ЭДТА никакого действия не оказывает, но совместное добавление Mg^{++} и ЭДТА повышает активность фермента в два раза. Такого эффекта не наблюдается в других субклеточных образованиях. По данным Нордлис [11], неорганические пирофосфатазы в зависимости от локализации—в микросомах, митохондриях и растворимой фракции—отличаются друг от друга рядом свойств и оптимумом pH. Следует отметить также, что очень активная высокоспецифическая неорганическая пирофосфатаза, присутствующая в растворимой фракции печени крыс, дает острый максимум при pH 7.5. Стимуляция этого фермента зависит от удаления эндогенного высокоингибирующего Ca^{++} хелатными агентами. А в наших экспериментах при кислом значении pH ЭДТА (10^{-2} , 10^{-4}) не оказывал никакого воздействия на митохондриальный и микросомальный ферменты.

В литературе имеются данные о других ферментах, отличающихся друг от друга в зависимости от локализации своими свойствами, но являющихся различными формами одного и того же фермента, например, растворимая и митохондриальная формы аспаратамиотрансферазы (КФ 2.6.1.1) [14] и растворимая и лизосомальная формы фосфопротенилфосфатазы (КФ 3.1.3.16) [12].

По данным ряда авторов [6], в мозговой ткани отсутствуют процессы начального этапа синтеза мочевины, в том числе и карбамилфосфата. Возможно, функция фермента, расщепляющего карбамилфосфат в

мозговой ткани, связана не с циклом мочевины, а с каким-то другим обменным процессом.

Проведенные нами исследования дают основание предположить, что митохондриальный и микросомальный ферменты являются различными молекулярными формами кислых фосфатаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манукян К. Г., Левонян К. М., Степанян А. А., Киракосян Л. Г., Казарян Т. И. *Вопр. биохимии мозга*, 12, 68, Ереван, 1977.
2. Норкесян Р. Р., Абуш Г. Т. *Биолог. ж. Армении*, 35, 3, 1982.
3. Baidijaz S. K. M., Ghira E., Bittencourt H. M. S., Chaimovich H. *Biochim. Biophys. Acta*, 391, 316, 1975.
4. Bowers W. E., De Dove C. J. *Cell. Biol.*, 32, 2, 333, 1976.
5. Bray H. G., Thorpe W. V. *Methods of Biochem. Analysis*, 1, 27, 1961.
6. Buntiatian H. Ch., Davtian M. A. *J. Neurochem.*, 13, 743, 1966.
7. Herman J. L., Nordin R. C. *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 180, 1976.
8. Jabuta J. M., Kimura R., Shindo J., Tomita K. I. *Biol. Chem.*, 67, 47, 1970.
9. Lowry O. H., Lopez J. A. *J. Biol. Chem.*, 162, 3421, 1946.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
11. Nordlie R. C., Lardy H. L. *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 309, 1961.
12. Paigen K., Griffiths S. K. *J. Biol. Chem.*, 234, 259, 1959.
13. Pedro Soares de Araujo, Miles V., Miranda O. *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 121, 1976.
14. Sheid B., Morris H. P., Roth I. S. *J. Biol. Chem.*, 240, 3016, 1965.
15. Tantzaki M. U., Bittencourt H. M. S., Chaimovich H. *Biochim. Biophys. Acta*, 485, 116, 1977.

Получено 13 VI 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 7, 546—550, 1987

УДК 577.112:547.915.5:591.412

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ СЕРДЦА КРЫСЫ

К. Л. ЛЕВОНЯН, К. Г. МАНУКЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, г. Ереван

Аннотация — Изучен фосфолипидный состав протеолипидов из сердца крысы, «очищенных» в разной степени от липидов. Фосфолипиды составляют 41,4% от массы неочищенных ПЛ и 18—13% от массы очищенных в зависимости от условий очистки. По мере очистки в протеолипиде сердечной мышцы снижается содержание менее прочно связанных с белком нейтральных фосфолипидов и возрастает содержание более прочно связанных кислых, особенно дифосфатидилглицеринов. Последние являются преобладающими фосфолипидами очищенных ПЛ, составляя более половины всех связанных фосфолипидов.

Անոտացիա — Առամենստիղվել է առևտների սրտից անջատված իրպիդներից տարրեր աստիաներ մարրված պրոտեոլիպիդների ֆոսֆոլիպիդային կազմը: Ֆոսֆոլիպիդները կազմում են ըմարրված ՊԼ-ների մասսայի 41,4%, իսկ մարրվածների՝ 18—13%, կախված մարրման պայմաններից: Մարրման քիմացրում սրտամկանի ՊԼ-ներում պակասում է ուղիտակուցի հետ ազիլի թույլ կապված ընդոր ֆոսֆոլիպիդների քանակը, իսկ ազիլի ամուր կապված թթու ֆոսֆոլիպիդների, հատկապես դիֆոսֆատիդիլցիդրիկների քանակը աճելանում է: Վերջինները հանդիսանում են մարրված ՊԼ-ների գերակշռող ֆոսֆոլիպիդները, որոնք կազմում են բոլոր կապված ֆոսֆոլիպիդների կեսից ազիլին: