

ВЛИЯНИЕ ВАНАДАТА НА СКОРОСТЬ  
ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ФОСФОЭФИРОВ В РАЗЛИЧНЫХ  
ОТДЕЛАХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫПАРСАДАНЯН Г. К., АДМУЦ Г. Т., АДМУЦ Г. Г., ТЕР-ТАТЕВОСЯН Л. П.  
Институт биохимии НАН Армении, Ереван

Ванадий относится к необходимым микроэлементам с малоизученной биологической функцией. В наших экспериментах обнаружено значительное понижение активности щелочной и кислой фосфатаз в нервной ткани (*in vitro*), зависящее от концентрации ванадата ( $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М). Более того, наблюдалось явное снижение чувствительности этих ферментов к  $\text{VO}_2^-$  при переходе от высших и относительно молодых отделов НС (полушария, мозжечок, продолговатый мозг) к древним. Активность фосфопротеинфосфатазы также ингибировалась в различных структурах ткани мозга, однако в спинном мозгу низкие концентрации ванадата ( $10^{-5}$  М) вызвали определенное повышение активности фермента. Лишь при повышении концентрации до  $10^{-3}$  М ванадий оказывал умеренно ингибирующий эффект. Обсуждается возможность существования в НС филогенетически разных форм фосфопротеинфосфатазы, отличающихся по их чувствительности к ванадату.

К настоящему времени установлено значительное распространение ванадия во внешней среде, высокое содержание его соединений в отходах и продуктах производственной деятельности современной цивилизации.

Соединения ванадия могут поступать в организм через дыхательный и пищеварительный тракты, а также через кожу. Оставшийся в организме ванадий откладывается в печени и костях. Ванадий способен проникать через ГЭБ. По данным многовариантного анализа, существует явная корреляция между соединениями ванадия в воздухе и общим уровнем смертности людей [1]. Интимный механизм взаимодействия между ванадием и ферментами пока остается открытым. Слабая изученность последствий, вызываемых воздействием производственных соединений ванадия на те или иные звенья метаболизма, послужила основанием для рассмотрения действия различных концентраций ванадата на активность некоторых ферментов, функция которых связана с переносом или отщеплением фосфатных группировок: фосфопротеинфосфатазы (ФПФаза, К.Ф. 3.1.3.16), щелочной (ЩФаза) и кислой (КФаза) фосфатаз (КФ 3.1.3.1 и 3.1.3.2—соответственно).

## Материалы и методы

В опытах использован головной и спинной мозг беспородных кроликов-самцов массой 1,8—2,2 кг.

Активность ФПФазы выявлялась в гомогенатах тканей (1:5 в/об) методом, основанным на определении отщепленного ферментом фосфора фосфопротенинов без их предварительного протеолиза [2], и выражалась в Е (нМ Р/мин на г ткани).

Для определения активности ЩФазы использовали 2 мМ раствор *n*-нитрофенилфосфата Na («Serva», ФРГ). Об активности фермента судили по количеству отщепившегося при pH 9,6 *n*-нитрофенола [3], с некоторыми модификациями: вместо аммиачной буферной смеси при определении ЩФазы использовали 20 мМ мединаловый буфер. Активность КФазы определяли в тех же условиях, но при pH 4,6.

## Результаты исследования

Информация относительно возможной регуляции процессов фосфорилирования-дефосфорилирования внутриклеточных ФП ванадатом ограничена, главным образом, данными о воздействии на некоторые протеникиназы, о ФПФазах же сведения крайне отрывочны и противоречивы [4—7]. Так, в зависимости от источника фермента, условий среды инкубирования и концентрации используемых соединений ванадия, в опытах *in vitro* был обнаружен как его активирующий эффект на ФПФазу [8], так и ингибирующий [5, 7]. Исходя из этого, представляло интерес выявить особенности пострецепторного действия ванадата на ФПФазу в различных отделах головного и спинного мозга. Результаты опытов, в которых об активности ФПФазы судили по скорости отщепления неорганического фосфата от сериновых и треониновых остатков молекулы казеина, приведены в табл. 1.

ФПФазная активность максимальна в больших полушариях мозга (152 Е), достаточно высока в продолговатом мозгу и мозжечке (104 и 95 Е, соответственно) и последовательно снижается при переходе от верхних отделов спинного мозга к нижним. В поясничном отделе она в 2,5 раза ниже, чем в больших полушариях. Однако различия эти не ограничиваются чисто количественными параметрами (табл. 1). При использовании широкого диапазона концентраций эффектора ванадата аммония (от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  М) выяснилось, что в наиболее «молодых» структурах (больших полушариях и продолговатом мозгу) фосфатазная активность относительно к казеину достаточно резистентна к присутствию ванадата в малых и средних концентрациях ( $10^{-9}$ — $10^{-5}$  М) и умеренно ингибируется (на 40—50%) миллимолярными его концентрациями. При анализе уровня активности в более «древних» образованиях головного мозга, и особенно в отделах спинного мозга, выяснилось, что ФПФаза моз-

Таблица 1

Влияние ванадата на активность фосфопротенифосфатазы в отделах  
головного и спинного мозга (нмоль Р<sub>n</sub> / г ткани/мин) (n=6)

Концентрации M <sup>II</sup>	Норма	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>
Отделы								
Большие полушария	152±14	114,4±1,0	113,7±14,0	126±6	132±9	108±5	88±5	74±6
Мозжечок	95±8	97±9	98,8±10,0	102,6±9,0	105±10	119±16	86±8	49±4
Продолговатый мозг	104±10	99,8±9,0	97,7±7,0	83±11	78±6	74,8±5,0	75,9±5,0	62,4±4,0
Шейный отдел	79±6	105±6	106±8	127±10	116±7	85,3±8,0	63,9±5,0	31,6±4,0
Грудной отдел	83±6	85±6	86±7	103±7	103±5	95±6	81±1	51±4
Поясничный отдел	60±7	90±6	108±8	121±8	125±9	89±8	68±6	51±6

жечка активируется примерно на 30%  $10^{-5}$  М ванадатом, хотя более высокие концентрации этого лиганда ( $10^{-3}$  М) почти вдвое понижают ферментативную активность. Максимальный положительный эффект обнаружен нами в отношении ФПФазы поясничного отдела спинного мозга, где активность фермента повышалась более чем вдвое в присутствии весьма низких концентраций ванадата ( $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М). Некоторое активирование ФПФазы ванадатом ( $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М) наблюдалось и в гомогенатах шейного и грудного отделов спинного мозга (на 25—30%), хотя и при увеличении содержания ванадата в среде до  $10^{-3}$  М активность фермента подавлялась соответственно на 60 и 35%. Активирование ванадатом обнаружено и в отношении высокомолекулярной ФПФазы из печени крыс [8]. В этом случае авторами было обнаружено 50%-ное активирование  $10^{-5}$  М ванадатом. При более высоких его концентрациях ( $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М) этот эффект несколько ослабевал. Моуек [9] установлен факт активирования ванадатом ( $10^{-5}$ — $10^{-10}$  М) другой фосфатазы— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -стимулируемой АТФазы в коре, подкорковых структурах и *Medulla oblongata* у молодых крыс. У взрослых же животных или при более высоких концентрациях ванадата проявлялся ингибирующий эффект.

Полученные нами результаты позволили дать ответ на некоторые принципиальные вопросы. Не исключая возможности действия ванадата путем активирования тирозинкиназной активности инсулинового рецептора [4] и другие дистанционные механизмы управления внутриклеточными процессами, мы обнаружили факт прямой *in vitro* регуляции ванадатом активности ФПФазы в нервных клетках, причем характер его воздействия в значительной мере определялся особенностями метаболизма и функций отдельных участков ЦНС. По мере перехода от филогенетически древних образований к более молодым отмечалось исчезновение активирующего эффекта наномолярных концентраций ванадата и превалирование неспецифического ингибирования ФПФазы высокими дозами этого препарата.

Что касается данных литературы о результатах взаимодействия ванадата с фосфатазами, гидролизующими низкомолекулярные фосфорные эфиры, бросается в глаза их противоречивость и разрозненность [5,9—11].

По нашим данным, в различных структурах головного мозга активность щелочной фосфатазы в норме оказалась значительно выше, чем в изученных отделах спинного мозга (табл. 2). В шейном и грудных отделах активность этого фермента не превышала 30—40% от фосфатазной активности больших полушарий.

Как видно из табл. 2, наибольшей чувствительностью к ванадату отличалась щелочная фосфатаза полушарий. В концентрации  $10^{-3}$  М ванадат примерно в 15 раз подавлял ее активность. В различных структурах спинного мозга активность щелочной фосфатазы ингибировалась в 6—9 раз в присутствии  $10^{-3}$  М ванадата в среде. Несколько большую резистентность щелочной фосфатазы грудного и поясничного отделов спинного мозга по сравнению с ферментом

из коры полушарий установили в присутствии низких концентраций ванадата ( $10^{-6}$  M).

Согласно полученным нами данным (табл. 3), сходное воздействие оказывал ванадат на активность кислой фосфатазы в указанных выше отделах НС. Ранее было показано ингибирующее действие ванадата на активность КФазы из других тканей крыс [12].

Таблица 2  
Влияние ванадата на активность щелочной фосфатазы в различных отделах головного и спинного мозга (имоль *л*-нитрофенола/г ткани/мин) (n=6)

Ко и центра ни (М) отделы	Норма	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Большие полушария	$2.5 \pm 1.5$	$2.57 \pm 1.8$	$2.37 \pm 2.2$	$1.64 \pm 1.0$	$7.4 \pm 4$	$1.9 \pm 3$
Мозжечок	$2.80 \pm 7$	$2.33 \pm 7$	$2.16 \pm 2.0$	$1.45 \pm 9$	$7.5 \pm 5$	$3.1 \pm 4$
Продолговатый мозг	$2.74 \pm 1.8$	$2.5 \pm 2.0$	$2.50 \pm 2.1$	$1.65 \pm 1.2$	$7.2 \pm 8$	$3.1 \pm 4$
Шейный отдел	$1.27 \pm 1.1$	$1.4 \pm 1.0$	$1.20 \pm 8$	$6.6 \pm 6$	$16.5 \pm 3$	$13.0 \pm 2.5$
Грудной отдел	$8.5 \pm 1.0$	$8.1 \pm 1.1$	$7.3 \pm 1.0$	$5.2 \pm 4$	$3.6 \pm 4$	$1.4 \pm 3$
Поясничный отдел	$1.68 \pm 1.9$	$1.61 \pm 1.8$	$1.61 \pm 8$	$8.6 \pm 6$	$3.6 \pm 3$	$2.0 \pm 2$

Таблица 3  
Влияние ванадата на активность кислой фосфатазы в различных отделах головного и спинного мозга (имоль *л*-нитрофенола/г ткани/мин) (n=6)

Ко и центра ни (М) Отделы	Норма	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Большие полушария	$1.639 \pm 60$	$1.410 \pm 5.3$	$9.50 \pm 4.5$	$4.91 \pm 2.1$	$5.50 \pm 2.0$	$2.62 \pm 1.9$
Мозжечок	$1.18 \pm 4.7$	$1.512 \pm 4.0$	$1.167 \pm 4.7$	$6.77 \pm 2.3$	$3.95 \pm 2.1$	$3.05 \pm 1.2$
Продолговатый мозг	$9.46 \pm 3.3$	$8.80 \pm 3.2$	$8.23 \pm 3.0$	$5.33 \pm 2.6$	$3.44 \pm 1.4$	$3.35 \pm 1.4$
Шейный отдел	$5.97 \pm 3.1$	$5.19 \pm 2.9$	$4.16 \pm 2.8$	$3.95 \pm 2.6$	$3.87 \pm 1.4$	$2.88 \pm 2.0$
Грудной отдел	$4.89 \pm 2.7$	$4.89 \pm 3.1$	$4.02 \pm 1.6$	$2.91 \pm 2.0$	$2.30 \pm 0.8$	$2.18 \pm 1.6$
Поясничный отдел	$6.31 \pm 3.1$	$6.30 \pm 3.3$	$5.40 \pm 3.3$	$4.87 \pm 1.9$	$3.74 \pm 2.2$	$3.10 \pm 1.1$

### Обсуждение результатов

Одной из причин возрастающего в последнее время интереса к биохимии ванадия является возможная регуляция им углеводно-фосфорного обмена. Среди путей регуляции ванадатом обменных процессов посредством фосфорилирования тирозинных остатков белков часто упоминается инсулинподобный механизм его действия на уровне изолированных клеток, тканей, очищенных инсулиновых рецепторов [13, 14], а также на диабетических крысах [15]. Поскольку химия соединений ванадия является весьма сложной [16], непросто сопоставить результаты непосредственного действия ванадата на компоненты клетки и данные о его воздействии на целостный организм. Биологические механизмы, которыми осуществляется его участие в регуляции углеводного обмена недостаточно ясны. Получены противоречивые данные о влиянии ванадата на активность различных фосфатаз, аденилатциклазы, фосфофруктокиназы, глюко-

киназы и др. [6]. Большой интерес представляет вероятная регуляция им деятельности протеникиназ и ФПФаз, контролирующих углеводный обмен. При оральном введении метаванадат нормализовал содержание глюкозы крови и стимулировал, подобно инсулину, липогенез в жировой ткани у крыс, страдающих стрептозотоциновым диабетом [17]. В целом, как и под действием ФПФаз, в присутствии ванадата наблюдался сдвиг в метаболических процессах от кататаболизма к анаболизму. В опытах на интактных клетках обнаружено, что этот эффектор повышает активность гликогенкиназы в адипоцитах [18]. Подобно инсулину, ванадат противодействовал активирующему действию адреналина на гликогенфосфоорилазу. Имеются убедительные доказательства в пользу того, что ванадат способен напрямую активировать тирозинкиназную активность инсулинового рецептора [4]. Скорее всего, причина этого заключается в том, что подобные реакции протекают с образованием промежуточных соединений, в которых присутствует пятиялентный фосфор [19].

В наших экспериментах ФПФазная активность различных отделов ЦНС крыс слабо (поясничной, грудной отделы спинного мозга) или умеренно (большие полушария, мозжечок) ингибировались ванадатом в концентрации  $10^{-3}$  М. В то же время, в пределах  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М концентраций этого эффектора ФПФазная активность в поясничном и шейном отделах спинного мозга значительно (в 1,5—2 раза) возрастала, тогда как в больших полушариях и продолговатом мозгу несколько понижалась. Поскольку ранее Парсаданияном и соавт. [20] было установлено наличие множественных форм ФПФаз в нервной ткани, можно предположить, что полученный нами эффект является суммарным, и в нервной ткани наряду со слабо ингибируемыми сериновыми фосфатазами имеются и более выражено ингибируемые тирозиновые ФПФазы, причем удельное содержание последних нарастает по мере приближения к наиболее сложным и филогенетически молодым формированиям головного мозга. По-видимому, сериновые фосфатазы широкого профиля действия сформировались на более ранних этапах возникновения и развития много- и даже одноклеточных организмов, тогда как более селективные тирозиновые ФПФазы, предназначенные для регуляции узкого круга фосфорилированных по тирозину белков, возникли на более поздних этапах филогенеза. В предварительных опытах, проведенных в лаборатории Р. Сонеп (Университет Dandy, Великобритания) на очищенных препаратах ФПФаз 1 и 2А Г. К. Парсаданияном было показано, что они резко отличаются чувствительностью к ванадату (неопубликованные данные).

Примечательен феномен активирования некоторых ФПФаз низкими концентрациями ванадата (табл. 1). Можно предположить, что в этих концентрациях ванадат взаимодействует с высокоаффинным аллостерическим участком молекулы фермента, тогда как в более высоких концентрациях лиганда преимущественно проявляется не-

специфическое конкурентное взаимодействие по учетку связывания молекулы фосфоэфира. В литературе также имеются единичные данные о том, что некоторые фосфатазы [9], в том числе и ФПФазы [8], активируются микро- и наномолярными количествами ванадата. В дальнейшем нами предполагается изучить кинетику взаимодействия ванадата с отдельными молекулярными формами ФПФаз.

## THE EFFECT OF VANADATE ON THE VELOCITY OF DEPHOSPHORYLATION OF PHOSPHOETHERS IN DIFFERENT PARTS OF NERVOUS SYSTEM

PARSADANIAN H. K., ADUNTS G. T., ADUNTS G. G., TER-TAIEVOSIAN L. P.

II. Ch. Bunlation Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Vanadium is one of the necessary microelements with less studied biological function. In our experiments it is discovered a noticeable decrease of alkaline and acid phosphatase activity in nerve tissue (in vitro), depending on the concentration of vanadate ( $10^{-7}$ – $10^{-3}$  M). Moreover, it was noted the obvious decrease of the sensibility of these enzymes to  $\text{VO}_3^-$  at passing from the highest and relatively young parts of NS (hemispheres, cerebellum, medulla oblongata) to archaic ones. Phosphoprotein phosphatase (PhPPase) activity was also inhibited in different structures of brain tissue, but in spinal cord the low concentrations of vanadate ( $10^{-5}$  M) caused a certain increase of the enzyme activity. Only at the increase of the concentration to  $10^{-3}$  M vanadate made a moderate inhibiting effect. It is discussed the possibility of the existence of phylogenetically various forms of phosphoprotein phosphatase in NS differing by the sensibility to vanadate.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Vanadium Env. Hith. Grifcala 81, World Hith Org., Geneva 1988.
2. Feinstein R. N., Folk M. E., J. Biol. Chem., v. 177, p. 339–344, 1949.
3. Шлыгин Г. К., Михлин С. Я. Вопр. мед. химии, № 6, с. 461–468, 1955.
4. Gresser M. J., Tracey A. S., Stankeiwicz P. J. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 75–57, 1987.
5. Lau K.-H. W., Farley J. R., Baylink D. L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 165–198, 1987.
6. Bosch F., Gomez-Foix A.-M., Arino J. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 351–362, 1987.
7. Tapley P., Rohrshneider L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 5, p. 261–278, 1989.
8. Khandelwal R. L., Enno T. L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 3, p. 107–120, 1986.
9. Mourek J. Physiol. Bohemoslov., v. 36, № 4, 341–345, 1987.
10. Missiaen I., Vrolix M., Rzymackers L., Casteelse R. Adv. Prot. Phosphatases, v. 5, p. 239–260, 1989.
11. Curii C., Pizzaro I. M., Ciancaglini P., Leone F. A. Сеп. Mol. Biol., v. 33, № 5, p. 625–635, 1987.
12. Адуц Г. Т., Парсаданян Г. К., Адуц Г. Г. ДАН АрмССР, т. 88, № 1, с. 35–38, 1989.

13. *Kiarlund J. K.* Cell., v. 41, p. 707-717, 1985.
14. *Tamura S., Brown T. A., Whipple J. N., Fujita-Iamaguchi I., Dubler R., Cheng K., Larner J. J.* Biol. Chem., v. 259, p. 6650-6658, 1984.
15. *Heytiger C. F., Tahiliani A. G., Newcill J. H.* Science, v. 227, p. 1471-1477, 1985.
16. *Nechay B. R., Ninira I. B., Neclay S. E., Post F. L., Grantham J. J.* Fed. Proc., v. 42, p. 123-132, 1983.
17. *Meyerovitch J., Farfel Z., Saeh J., Shechter I. J.* Biol. Chem., v. 262, № 14, p. 6658-6662, 1987.
18. *Tamura S., Brown T. A., Dubler R. E., Larner J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 113, p. 80-85, 1983.
19. *Chasteen N. D.* Struct. Bonding (Berlin), v. 53, p. 105-137, 1983.
20. *Парсадилян Г. К., Бунтян Г. К.* ДАН СССР, т. 257, № 5, с. 1258-1261, 1981.

11

Поступила 23. VIII. 1991