

УДК 577.152.313

БИОХИМИЯ

Г. Т. Адуши, Г. К. Парсаян, Г. Г. Адуши

Зависимость активности щелочной и кислой фосфатаз
 от различных концентраций ванадата

(Представлено академиком АН Армянской ССР А. А. Галояном 25/IV 1988)

Ванадий является одним из достаточно распространенных в литосфере элементов ($1,5 \cdot 10^{-2}$ вес. %), но находится он преимущественно в рассеянном состоянии. Ионы ванадата имеются в асфальтах, углях, нефти. Сырьем для него служат либо полиметаллические руды, либо шлак, остающийся после выплавки черного металла, где он находится в виде V_2O_5 . Окисел этот легко растворим в слабых щелочах. В организм окислы ванадия поступают либо через легкие с пылью, либо в пищеварительный тракт с пищей, вызывая интоксикацию с разнообразными проявлениями. В биохимическом отношении механизм действия соединений ванадия изучен крайне слабо.

Было замечено, что некоторые коммерческие препараты АТР из мышц лошади (фирмы Sigma), содержащие примеси ванадата, вызывают ингибирование активности АТРаза (¹⁻³). Эти наблюдения послужили основанием для последующих исследований роли ванадата в регуляции активности АТРаза (⁴⁻⁵). Как известно, для проявления деятельности Na^+ , K^+ АТРаза требуется наличие ионов Mg^{2+} , повышающих активность ее до 6 раз. В то же время 0,5—20 мкМ ванадата резко подавляют активность фермента. Совместное же применение Mg^{2+} и ванадата не вызывает существенных изменений. Полагают, что оба указанных фактора взаимодействуют с одним и тем же участком связывания на молекуле фермента. Насыщение активного центра Na^+ приводило к усилению эффекта ванадата. Ванадат в низких концентрациях (10^{-6} — 10^{-7} М) вызывал также торможение *p*-нитрофенилфосфатазной активности Na^+K^+ -АТРазной системы (⁶). Влияние ванадата на ферментативное дефосфорилирование *p*-нитрофенилфосфата осуществляется по механизму конкурентного ингибирования (⁷).

Ввиду того, что наиболее четкие патологические изменения при интоксикации ванадием наблюдаются в легких и желудочно-кишечном тракте, представляло несомненный интерес изучить изменения в активности широко представленных в этих органах фосфоэстераз под действием различных концентраций ванадата. Поскольку выведение ванадата из организма осуществляется в основном через почки, сдвиги в активности указанных ферментов были нами изучены также и в этой ткани. Щелочную и кислую фосфатазы определяли в гомогенатах тканей белых крыс (легкие, тонкий кишечник, почки). В отдельных экспериментах использовали кристаллический препарат щелочной

фосфатазы из кишечника телят (Sigma, США). В качестве субстрата использовали *п*-нитрофенилфосфат (Seiva, ФРГ). Из пятивалентных соединений ванадия рассмотренно действие V_2O_5 и NH_4VO_3 . Реакционная смесь содержала 0,1 мл гомогената ткани (1:10 или 1:20, в/об); 5 мл 2мМ *п*-нитрофенилфосфата, приготовленного на медуналовом буфере рН 9,6 (для щелочной фосфатазы) или 5,0 (для кислой фосфатазы) и 0,1 мл ванадата в пределах концентраций 1мМ—10 нМ. В предварительных экспериментах в инкубационную смесь вводили 50 мкг высокоочищенного препарата щелочной фосфатазы. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося *п*-нитрофенола.

Влияние ванадата на активность неспецифических фосфомоноэстераз (мкМ *п*-нитрофенола/мин. на 1 г ткани)

Ткань	Щелочная фосфатаза						Кислая фосфатаза							
	Контроль	В а н а д а т, М						Контроль	В а н а д а т, М					
		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Легкие	0.53	0.53	0.50	0.46	0.43	0.28	0.20	0.75	0.75	0.55	0.50	0.42	0.28	0.17
% ингибирования		0	5.7	13.3	18.9	28.4	62.3		0	26.7	33.4	44	62.7	77.4
Почки	1.3	1.26	1.25	1.16	1.05	0.81	0.46	0.76	0.76	0.57	0.37	0.28	0.17	0.12
% ингибирования		3.1	3.9	10.8	20	37.7	64.7		0	25	51.4	63.2	77.7	84.3
Кишки	0.91	0.91	0.86	0.71	0.53	0.38	0.13	0.14	0.14	0.12	0.11	0.08	0.05	0.03
% ингибирования			5.5	22	41.8	58.3	85.8		0	10.8	21.5	41.5	60	73.6
Очищенный* фермент	0.22	0.20	0.19	0.18	0.17	0.14	0.02							
% ингибирования		9.1	13.7	18.2	22.8	36.4	91							

* Активность выражена в мкМ *п*-нитрофенола/мин на 1 мг очищенного фермента

Данные, полученные с использованием кристаллического фермента, приведены в таблице. Как видно из таблицы, ванадат во всех использованных концентрациях подавлял активность этого фермента, при этом 1 мМ ванадата практически полностью ингибировал щелочную фосфатазу, тогда как в концентрации 10 нМ ванадат вызывал лишь 13,7%-ное снижение активности. Представляло интерес изучить также эффект ванадата на активность щелочной и кислой фосфатазы в условиях сложной системы, включающей все присутствующие в клетке компоненты. Для этих целей наиболее целесообразным представлялось изучить действие ванадата на фосфатазную активность в тканевых гомогенатах. Из данных следует, что 1 мМ ванадата подавляет около 85% исходной активности щелочной фосфатазы в тонком кишечнике, а кислой фосфатазы—на 73,6%. 10 нМ концентрация ванадата не вызывает сдвигов в активности щелочной фосфатазы кишечника, а активность кислой фосфатазы изменяется незначительно.

Изменения в активности кислой и щелочной фосфатаз легких отражены в таблице. Эти ферменты оказались чувствительными к ванадату. Миллимолярные количества ванадата подавляли активность щелочной фосфатазы на 62%, а кислой — на 77,4%. С уменьшением концентрации ванадата в реакционной среде снижался и его эффект. Особый интерес представляло изучение воздействия ванадата на фосфатазы почек, поскольку эта ткань призвана выводить из организма токсичные вещества и продукты катаболизма. Кислая фосфатаза почек более чувствительна к высоким концентрациям ванадата, чем щелочная, 1 мМ ванадата в этом случае вызывал полное ингибирование фермента. Подобные результаты были получены и в случае, когда вместо V_2O_5 вводили NH_4VO_3 .

Поскольку концентрация субстрата в этих условиях вдвое превышала концентрацию ингибитора, можно допустить, что сродство активного центра фермента с ванадатом сильнее, чем с субстратом, что предполагает конкурентный характер этого ингибирования. Предполагают, что ортованадат связывается с тем же центром фермента, что и фосфат, образуя тригонально-бипирамидальный комплекс, напоминающий промежуточную форму фосфорилированного фермента, образующуюся при ферментативном гидролизе моноэфиров ортофосфата (⁸⁻¹⁰).

Настоящее исследование показало, что неспецифические фосфоэстеразы различных тканей практически однозначно реагируют с ванадатом и его присутствие может вызвать серьезные нарушения фосфорного обмена в организме.

Поскольку наличие в воздухе уже 0,01 мг/л V_2O_5 вызывает острые отравления у людей, загрязнение ванадатом окружающей среды не только представляет серьезную опасность для лиц, работающих на соответствующих производствах, но и является общеэкологической проблемой. Это диктует необходимость дальнейшего досконального исследования воздействия ванадата на ферменты, участвующие в фосфорном обмене.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Գ. Ք. ԱՇՈՒՆՅ, Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Գ. Գ. ԱՇՈՒՆՅ

Հիմնային և քրիստալին ֆոսֆատազների ակտիվության կախվածությունը վանադատի տարրեր խտություններից

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆոմոնոէսթերազների ակտիվության կախվածությունը վանադատի տարրեր խտություններից՝ սպիտակ առնետների թոքերի, երիկամների, աղիների հոմոգենատներում, ինչպես նաև մաքուր հիմնային ֆոսֆատազայի վրա:

Պարզվել է, որ վանադատի 10^{-6} — 10^{-3} Մ բանակները ակնհայտ չափով ընկճում են ինչպես հիմնային, այնպես էլ թթու ֆոսֆատազայի ակտիվությունը: Վանադատի խտության մեծացման հետ զուգընթաց նրա ընկճող ազդեցությունը մեծանում է՝ հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ձեռնարկով 62—91%, իսկ թթու ֆոսֆատազայի ակտիվությունը՝ 73—84%:

Ընթացիկում է, որ վանադատը կարող է որոշակի տեղաշարժ մտցնել ֆոսֆորային միացությունների նյութափոխանակության մեջ: Այդ ասումով սույն հետազոտությունը ունի անմիջական կապ էկոլոգիական որոշ հարցերի լուծման հետ:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ L. A. Brauge, I. M. Glynn, Nature, v. 268, p. 355 (1977). ² L. A. Brauge, I. M. Glynn, Nature, v. 272, p. 551 (1978). ³ Y. Y. Grantham, I. M. Glynn, Amer. J. Physiol., v. 236, № 6, 530 (1979). ⁴ G. H. Bond, P. M. Hudgins, Biochemistry, v. 18, p. 325 (1979). ⁵ J. Mouček, Physiol. Bohemoslovenica, 36, p. 341 (1987). ⁶ Գ. Վ. Կիկվաշվիլի, Է. Գ. Գոցիրիձե, Ս. Գ. Ծափաձե, Собр. АН ГССР, т. 98, № 1 (1980). ⁷ М. И. Вегелова, Е. С. Чухрай и др., Вест. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия, т. 26, № 2 (1981). ⁸ V. Lopez, T. Stevens, R. N. Lindquist, Arch. Biochem. Biophys., v. 175, p. 31 (1976). ⁹ T. W. Reid, I. B. Wilson, The Enzymes, v. 4, N. Y., p. 373 (1971). ¹⁰ S. I. Benkovic, K. I. Schray, The Enzymes, v. 8, N. Y., p. 201 (1973).