

УДК 577.15

Исследования механизма действия ультразвука и продуктов сонолиза на активность щелочной фосфатазы

**Л.П. Тер-Татевосян, В.О. Барсегян, Л.Н. Аракелян,
С.Г. Чаилян**

*Институт биохимии им. акад. Г.Х.Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, ультразвук, NO_2^- , NO_3^- , супероксиддисмутаза, цитохром С, цинк

Механизм действия физических факторов, таких как радиация, магнитное поле, давление, ультразвук, тесно связан с физико-химическими изменениями внутренней среды организма. Ультразвук (УЗ) вызывает микровибрацию, которая приводит к изменению функционального состояния клеток: повышается проницаемость клеточных мембран, изменяется кислотно-щелочное равновесие, усиливаются процессы диффузии и осмоса, происходят изменения во взаимоотношении субмикроскопических структур в клетке, а также способствует пространственной перестройке внутриклеточных молекулярных комплексов.

Имеющиеся в литературе сведения не дают четкого представления о механизме действия УЗ на щелочную фосфатазу (ЩФ) – фермента, занимающего важное место в метаболизме фосфорного обмена. ЩФ–металлопротеин, регулирующийся специфическими и неспецифическими активаторами и ингибиторами. Большая часть исследований, относительно данного фермента, проведена на гомогенатах, тканях и субклеточных фракциях [2-4, 6].

В то же время нет никаких данных, относительно механизма действия непрерывного УЗ средних интенсивностей на очищенную фосфатазу. В настоящей работе мы задались целью восполнить сведения о действии УЗ волн на ферментативную активность очищенной ЩФ и определить его регулируемую роль в структуре данной гидролазы.

Материал и методы

Опыты ставились на очищенном ферменте фирмы «Calbiochem», выделенном из слизистой оболочки тонких кишок телят. В 1 мл раствора

содержится 8,4 мг протеина, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-7}$ М. Субстратом служил паранитрофенилфосфат бария в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ М (рН 10,5). Для определения активности ферментов были использованы спектрофотометрические методы [7]. В качестве действующего физического фактора использовался ультразвук частотой 880кГц, интенсивностью 2-6 Вт/см² и длительностью воздействия 5-20 минут. Ультразвуковое воздействие проводили с использованием аппаратов типа УЗТ-1.01Ф. Озвучивание проводилось в специальной термостатированной кювете, изготовленной нами, где температура была постоянной (25°C). Данные на графиках приведены в процентах от нормы (P/P₀).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показано действие разных интенсивностей УЗ на активность ЩФ, измерение которой производилось сразу после озвучивания фермента и после хранения его в течение 24 часов. Выявлено, что при максимальной интенсивности ингибирующее действие УЗ после озвучивания составляет 10%, а в последующие 24 часа достигает 70%.

С целью восстановления активности, сразу после озвучивания, фермент подвергали диализу против дистиллированной воды в течение суток при температуре 4°. Выяснилось, что диализ снимает ингибирующее действие УЗ (рис.2).

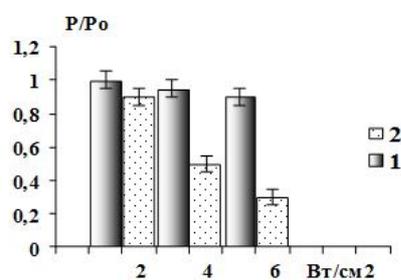


Рис. 1. Действие УЗ волн разных интенсивностей на активность ЩФ:
1 – свежий фермент,
2 – после хранения 24 часа

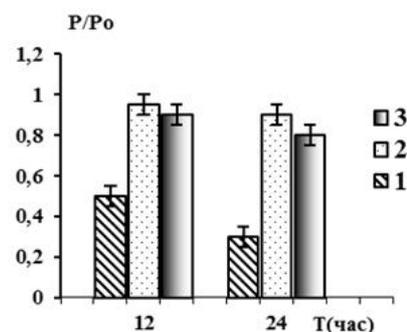


Рис. 2. Активность озвученной и неозвученной ЩФ после диализа:
1 – активность озвученного фермента после хранения 12 и 24 часов,
2 – активность фермента после диализа в течение 12 и 24 часов,
3 – активность озвученного фермента после диализа в течение 12 и 24 часов

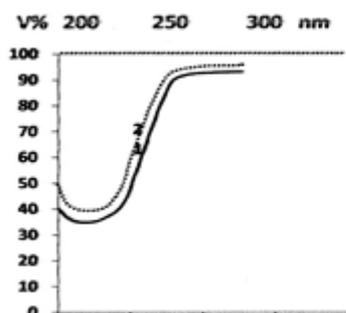


Рис. 3. Спектр пропускания дистиллированной воды после озвучивания и хранения в течение 24 часов: 1 – спектр пропускания воды сразу после озвучивания, 2 – спектр пропускания озвученной воды после хранения в течение 24 часов

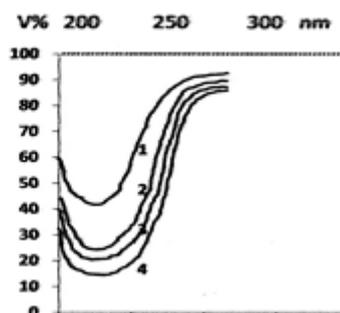


Рис. 4. Спектр пропускания NO_2^- , NO_3^- в зависимости от продолжительности озвучивания: 1 – после 5 мин, 2 – после 10 мин, 3 – после 15 мин, 4 – после 20 мин

Под действием ультразвуковых волн происходит сонолиз воды с образованием активных радикалов (H^\cdot , OH^\cdot , O_2^\cdot), при рекомбинации которых образуются молекулы H_2O_2 и NO_2^- , NO_3^- [5]. Приведен спектр пропускания воды сразу после озвучивания и после хранения в течение 24 часов (рис. 3).

Спектральным методом нами была определена концентрация NO_2^- , NO_3^- , которая при 10-минутном озвучивании в 10 мл дистиллированной воды составляла 10^{-6} М (рис. 4).

Учитывая это, в последующих экспериментах мы добавляли к ферменту озвученную воду и изучали динамику активности исследуемого белка. По последним литературным данным, в молекуле ЩФ имеется четыре металлосвязывающих участка, которые связаны с ионами цинка, из них одна пара стабилизирует четвертичную структуру фермента (структурная), другая, каталитическая, принимает участие либо в связывании субстрата с ферментом, либо в гидролизе субстрата [8]. При добавлении к ферменту активной воды с цинком (10^{-5} М) ингибирования ЩФ не наблюдается (рис.5).

Нами ранее было показано, что цинк активного центра фермента блокируется SH-группами цистеина, но при добавлении эквивалентных количеств цинка и цистеина ингибирующее действие последнего снимается цинком [1]. При добавлении цистеина с активной водой ингибирование

фермента наблюдается в первые 12 часов хранения, при дальнейшем хранении активность ЩФ восстанавливается (рис.6).

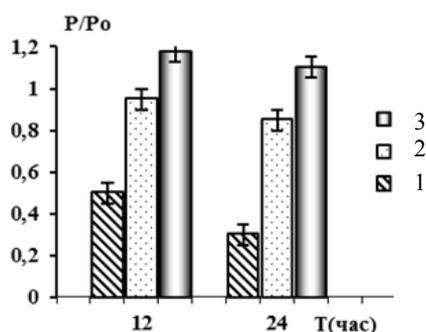


Рис. 5. Действие цинка и озвученной воды на активность ЩФ при хранении 12 и 24 часов:

1 – активность фермента с озвученной водой, 2 – активность фермента при добавлении цинка, 3 – активность фермента при добавлении цинка с озвученной водой

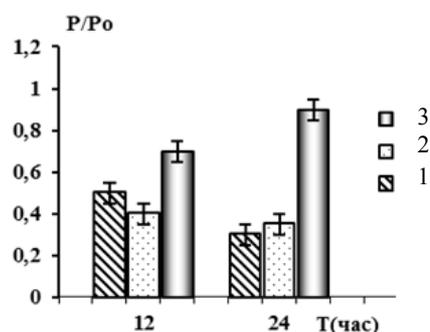


Рис. 6. Действие цистеина и озвученной воды на активность ЩФ:

1 – активность фермента с озвученной водой, 2 – активность фермента при добавлении цистеина, 3 – активность фермента при добавлении цистеина с озвученной водой

Так как при воздействии УЗ образуются супероксидные радикалы, которые могут быть причиной ингибирования активности фермента, то нами было испытано действие активной воды в присутствии супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), для которой субстратом является супероксидный радикал. Данные рис. 7 показывают, что супероксиддисмутаза снимает ингибирующее действие активной воды, но не полностью.

Согласно литературным данным [9-13], в активной воде одним из образовавшихся конечных продуктов является перекись водорода. В наших опытах показано, что перекись водорода является ингибитором для ЩФ, но при комбинации с активной водой этот эффект уменьшается (рис.8).

Для выявления характера действия H_2O_2 и NO_2^-, NO_3^- на металлосодержащие ферменты мы испытали действие активной воды на цитохром С. Показано, что восстановленная форма белка в течение 30 минут переходит в окисленную, а при дальнейшем хранении (24ч) вновь восстанавливается (рис.9).

На основании полученных результатов можно построить несколько возможных схем действия продуктов, образовавшихся в воде под влиянием УЗ на ЩФ: а) фрагментация молекулы белка, б) конформационные изменения структуры белка. Так как не белок, а растворитель

подвергается прямому действию УЗ, то фрагментация молекулы фермента исключается.

По нашим наблюдениям незначительные конформационные изменения в молекуле белка ответственны в определенной мере за ингибирование фермента. В основном этот эффект связан с действием продуктов, которые рекомбинируются из активных радикалов, образовавшихся при сонолизе воды. Этот вывод подтверждается диализом фермента с активной водой, после которого ЦФ сохраняет активность. Вероятно, из среды выходят H_2O_2 и NO_2^- , NO_3^- , тем самым исключая возможность их непосредственного контакта с активным центром фермента.

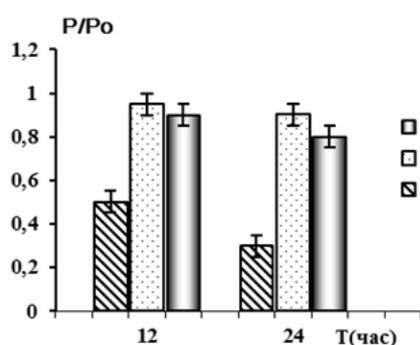


Рис. 7. Действие супероксиддисмутазы и озвученной воды на активность ЦФ при хранении 12 и 24 часов:

1 – активность фермента с озвученной водой, 2 – активность фермента при добавлении супероксиддисмутазы, 3 – активность фермента при добавлении супероксиддисмутазы с озвученной водой

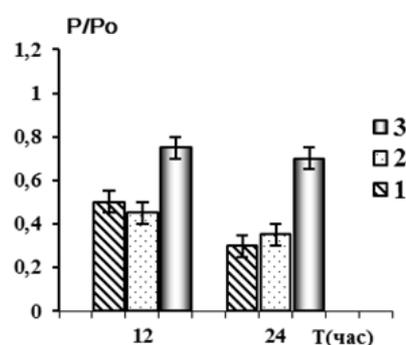


Рис. 8. Действие перекиси водорода и озвученной воды на активность ЦФ:

1 – активность фермента с озвученной водой, 2 – активность фермента при добавлении перекиси водорода, 3 – активность фермента при добавлении перекиси водорода с озвученной водой

Процесс полного ингибирования фермента под действием активной воды осуществляется в течение 24 часов, в то время как ингибирование под действием цистеина происходит всего лишь за несколько минут.

Связывание цистеина с цинком активного центра происходит значительно быстрее, чем с NO_2^- , NO_3^- . Это наблюдается в начальной стадии ингибирования фермента и при дальнейшем его активировании, сопровождающемся окислением уже связанных SH-групп с цинком активного центра.

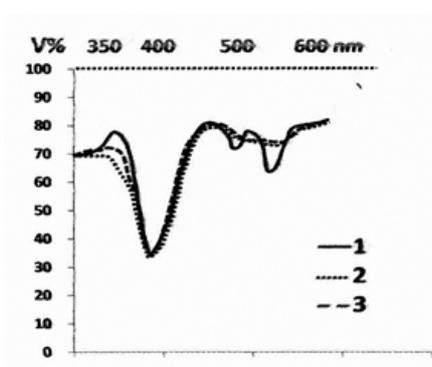


Рис. 9. Действие озвученной воды на цитохром С:

1 – спектр пропускания цитохрома С, 2 – спектр пропускания цитохрома С при добавлении озвученной воды, 3 – спектр пропускания цитохрома С при хранении в течение 24 часов после добавления озвученной воды

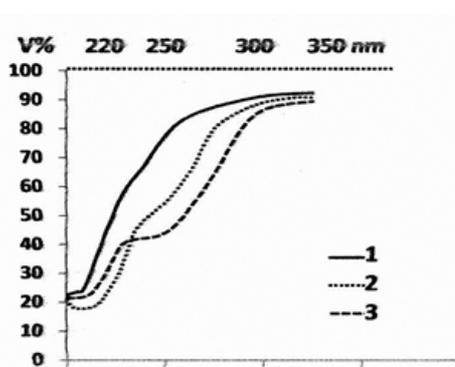


Рис.10. Изменение спектра пропускания цистеина под действием озвученной воды:

1 – спектр пропускания цистеина, 2 – спектр пропускания цистина, 3 – спектр пропускания цистеина с озвученной водой при хранении в течение 24 часов

В подтверждение этих предположений приведены спектры пропускания по переходу цистеина в цистин при хранении (рис. 10). При добавлении же цинка ингибирующее действие активной воды полностью снимается, так как концентрация металла в растворе увеличивается и не дает возможности NO_2^- и NO_3^- связаться с цинком, играющим роль кофактора. Предполагается, что ингибирование ЩФ связано с образованием в активной воде перекиси водорода, однако при увеличении концентрации ее в среде, наоборот, наблюдается повышение активности фермента, что связано с уменьшением образования NO_2^- и NO_3^- .

Таким образом, активность ЩФ можно регулировать, меняя интенсивность УЗ и концентрации регуляторов ферментативной активности, действие которых приводит к образованию в воде разных концентраций NO_2^- , NO_3^- .

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что механизм действия УЗ средних интенсивностей связан с образованием активных радикалов, способных инициировать как восстановительные, так и окислительные процессы, в зависимости от растворенных газов и химических соединений в кавитационных полостях.

Продукты сонолиза воды, образующиеся под действием УЗ, блокируют цинк активного центра ЩФ, тем самым затрудняя нуклеофильную атаку гидроксильной группы серина на фосфор.

Поступила 01.07.13

**Ուլտրաձայնի ներգործությունից առաջացած նյութերի
ազդեցության մեխանիզմը հիմնային ֆոսֆատազի
ակտիվության վրա**

Լ.Պ.Տեր-Թադևոսյան, Վ.Հ.Բարսեղյան, Լ.Ն.Արակելյան, Ս.Գ.Չախլյան

Ուլտրաձայնի ազդեցության ներքո ջրում առաջացած մի շարք միացություններ՝ NO_2^- , NO_3^- , H_2O_2 , փոխազդելով ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի ցինկի հետ, ընկճում են նրա ակտիվությունը:

Պարզվել է, որ հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը կարելի է փոփոխել, փոփոխելով ուլտրաձայնի ինտենսիվությունը, ճառագայթման ժամանակը, ինչպես նաև ճառագայթումից առաջ ջուրը հազեցնելով տարբեր կոնցենտրացիաների ակտիվատորներով և ինհիբիտորներով:

**Mechanism of action of disintegration products
formed by ultrasound treatment on the activity
of alkaline phosphatase**

L. P. Ter-Tatevosyan, V. H. Barseghyan, L. N. Arakelyan, S. G. Chailyan

It has been shown that the activity of purified alkaline phosphatase depends on the changes of ultrasound treatment intensity and the concentration of this enzyme regulators. It is accompanied by formation of different quantities of NO_2^- and NO_3^- , H_2O_2 . These compounds in combination with ultrasound treatment block zinc of the enzyme active centre and inhibit the action of hydroxyl group of serine on phosphorus.

Литература

1. *Адуниц Г.Т., Саркисян Л.В.* Участие некоторых факторов в регуляции активности щелочной фосфатазы. Биол. журн. Армении, 1973, 2, с.26.
2. *Акопян В.Б., Ершов Ю.А.* Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами (Ультразвук в медицине), М., 2006.
3. *Барсесян В.О., Адуниц Г. Т., Сарвазян А.П.* Влияние модулированного ультразвука на активность щелочной фосфатазы. Уч. зап. Ер. гос. ун-та, 1976, 1, с.84.
4. *Пашовкин Т.Н., Глазунов А.Л., Коломыцева М.П.* Влияние амплитудно-модулированного ультразвука на активность ферментов крови. Институт биофизики клетки РАН, Пушино, 1999.
5. *Полоцкий И.Г.* Определение H_2O_2 , и NO_2^- , NO_3^- в воде, экспонированной в ультразвуковом поле. Жур.орг.химии, 1947,17,2, с.649.

6. *Шепелева И.С., Топоров Ю.А., Топорова С.М.* III выездная сессия. Секция «Физические и технические основы применения ультразвука в медицине и физиологии», Пушкино, 1976.
7. *Шлыгин Г.К., Михлин С.Я.* Простая методика определения фосфатазы в плазме крови. *Вопр. мед. химии*, 1955, 1, с. 461.
8. *Anderson R.A., Bosron W.F., Kennedy F.S., Vallee B.L.* *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 1975,72, 8, p.2989.
9. *Aubar M., Pecht J.* *Phys. Chem.*, 1969, 68, p.352.
10. *Del Duca M., Jeager E., Hovorkci F.* 1. *Acoust Soc. Amer.*,1958 ,30, p.301.
11. *Griffing V., Fitzgerald M. B., Siliivan J.* Chemical effects of ultrasonics. *J. Chem. Phys.*, 1956,25,p.926.
12. *Pospisilova J.J.* *Naturforsch*,1966, 21 B, p.1230,.
13. *Weissber A.J.* *Acoust. Soc. Amer.*, 1960,32, p.283.