

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1986

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

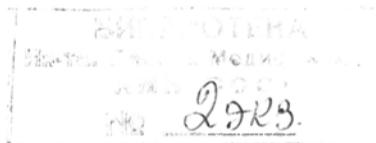
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

Н. Ф. Беляева, Е. Ю. Глинка, И. Р. Никулин, З. С. Каган

ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛАТОМ И САЛИЦИЛАТОМ ФРУКТОЗО-1,6-БИСФОСФАТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА К АЛЛОСТЕРИЧЕСКОМУ ИНГИБИРОВАНИЮ АМФ

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Купанна, Московская область

Аллостерическое ингибирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11) АМФ является одним из основных механизмов, контролирующей активность этого ключевого фермента глюконеогенеза. Ацетилсалицилат и салицилат, являясь терапевтическими агентами, относятся также к числу соединений, которые могут снижать чувствительность фруктозо-1,6-бисфосфатазы к ингибированию АМФ, что было показано для фермента из почек свиньи [7] и печени цыпленка [5]. Исследования, проведенные с ферментом из почек свиньи [7], показали также, что подсалицилат способен, подобно АМФ, защитить фруктозо-1,6-бисфосфатазу от модификации пиродоксаль-5'-фосфатом, приводящей к десенсibilизации фермента к ингибированию АМФ. Эти данные указывают на связывание салицилатов в АМФ-связывающем центре фермента и согласуются с представлением о том, что салицилат связывается в аденозинсвязывающем домене ряда дегидрогеназ [4] и киназ [10, 13] и о структурном сходстве этих доменов у различных ферментов [3].

В тканях животных фруктозо-1,6-бисфосфатаза представлена разными изоферментами, различающимися по чувствительности к аллостерическому ингибитору [8]. Для наших исследований были выбраны 2 изофермента фруктозо-1,6-бисфосфатазы: изофермент печени (этот же изофермент присутствует в почках) и изофермент скелетных мышц, обладающий очень высокой чувствительностью к АМФ.

Целью настоящей работы являлось сравнение действия ацетилсалицилата и салицилата на фруктозо-1,6-бисфосфатазу из печени и скелетных мышц кролика, что может представлять не только теоретический, но и практический интерес в связи с широким использованием ацетилсалицилата (аспирин) в медицинской практике.

Методика

В работе использованы частично очищенные препараты фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени и скелетных мышц кролика, которые получали следующим образом. Печень промывали холодным физиологическим раствором, измельчали ножницами, затем гомогенизировали в 5 объемах 0,25 М сахарозы, содержащей 0,03 М трис-НСl, рН 7,8, и центрифугировали 90 мин при 50 000 g. Белки надосадочной жидкости фракционировали насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащим 0,1 мМ ЭДТА, при рН 7,6 в интервале от 0,50 до 0,65 от полного насыщения, и полученный осадок, растворенный в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,5, использовали в качестве ферментного препарата.

Мышцы спины и задних конечностей кролика очищали от соединительной ткани, пропускали через мясорубку и гомогенизировали с 4 объемами 0,03 М трис-НСl буфера рН 8,0, содержащего 0,15 М КСl. Белки экстрагировали 30 мин при перемешивании на холоду и центрифугировали при 50 000 g 90 мин. К надосадочной жидкости добавляли твердый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и рН белкового раствора поддерживали на уровне 7,6, добавляя водный раствор аммиака. Осадок, полученный при насыщении 0,65—0,80, собирали центрифугированием, растворяли в 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,5 и использовали в качестве ферментного препарата.

Активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы определяли по восстановлению НАДФ⁺ в системе, сопряженной с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и фосфогексоизомеразой при 30 °С. Стандартная инкубационная смесь (объемом 3 мл) включала в себя 50 мМ трис-НСl рН 7,5; 2,5 мМ MgCl₂; 0,1 мМ ЭДТА; 0,15 мМ НАДФ⁺, избыток сопрягающих ферментов и 0,01 мл ферментного препарата, содержащего около 0,1 ед. фермента. Реакцию начинали с добавления фруктозо-1,6-дифосфата в конечной концентрации 70 мкМ.

Фосфогексоизомеразу из мышц кролика получали с помощью модифицированного метода Филлипа и соавт. [11].

Концентрацию АМФ, используемого в качестве аллостерического ингибитора, определяли по поглощению при 259 нм, используя для расчетов молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 15\,300 \text{ м}^{-1}\text{см}^{-1}$.

В работе использовали глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу фирмы «Гинка» (Швейцария), НАДФ⁺ и АМФ фирмы «Reanal» (ВНР). Фруктозо-1,6-дифосфат монокальциевую соль («Reanal») переводили в калиевую соль, используя Дауэкс-50 (100—200 меш) фирмы «Serva» (ФРГ).

При работе с фруктозо-1,6-бисфосфатазой из мышц кролика препарат НАДФ⁺ очищали

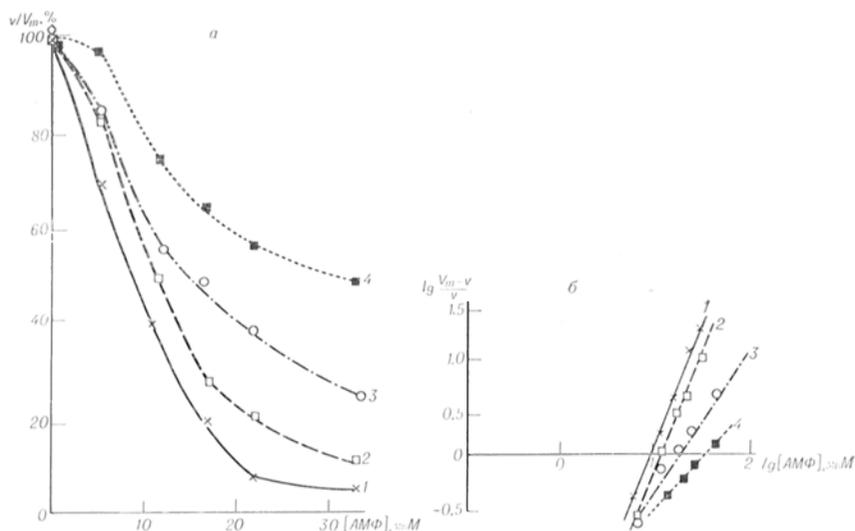


Рис. 1. Влияние ацетилсалицилата на чувствительность к ингибированию АМФ фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени кролика в обычных координатах (а) и координатах Хилла (б).

1 — без ацетилсалицилата, 2—4 — концентрации ацетилсалицилата 5, 15 и 25 мМ соответственно. Здесь и на рис. 2 и 3 по оси ординат — относительная активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Величины коэффициентов Хилла приведены в таблице.

от примесей АМФ по разработанному ранее методу [2].

В экспериментах использовали фармакологические субстанции салицилата натрия и ацетилсалициловой кислоты.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, а, добавление ацетилсалицилата Na в концентрациях от 5 до 25 мМ не влияет на активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени кролика в отсутствие АМФ. В то же время ацетилсалицилат снижает чувствительность фермента к ингибированию АМФ. Величины $[1]_{0,5}$, т. е. концентрации АМФ, вызывающей 50 % ингибирование фермента, изменяются от 9 мкМ в отсутствие ацетилсалицилата до 31 мкМ в присутствии его (25 мМ; см. таблицу). Следует отметить, что во всех случаях при достаточном увеличении концентрации АМФ можно было полностью подавить активность фермента, что позволяет нам рассчитывать величины $[1]_{0,5}$, не прибегая к вычитанию остаточной активности, и пользоваться обычной формой уравнения Хилла для расчета коэффициентов кооперативности (h). Из рис. 1, б и таблицы видно, что ацетилсалицилат влияет на кооперативные свойства фермента. Это следует из снижения величины h с 2,3 в отсутствие ацетилсалицилата до 1,25 в его присутствии (25 мМ).

Подобно ферменту из печени, фруктозо-1,6-бисфосфатаза из мышц кролика подвергается частичной десенсибилизации по отношению к ингибированию АМФ в присутствии ацетилсалицилата (рис. 2, а). Представленные в таблице величины $[1]_{0,5}$ и h свидетельствуют не только о более высокой чувствительности к АМФ изофермента из мышц, но и о том, что ему присуща более низкая кооперативность при взаимодействии аллостерических центров ($h=1,6$ в отсутствие ацетилсалицилата). Добавление ацетилсалицилата несколько снижает кинетическую кооперативность фермента ($h=1,3$).

Сравнение представленных в таблице величин $[1]_{0,5}$ для фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени и скелетных мышц кролика показывает, что степень защиты обоих ферментов от ингибирования АМФ в присутствии ацетилсалицилата практически одинакова и для увеличения значения $[1]_{0,5}$ вдвое необходимо добавление 12—15 мМ ацетилсалицилата.

Сравнение действия ацетилсалицилата и салицилата показало, что салицилат более эффективно защищает фруктозо-1,6-бисфосфатазу из печени (рис. 3, а) и скелетных мышц кролика (рис. 3, б) от ингибирования АМФ.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что, оба изофермента фруктозо-1,6-бисфосфатазы

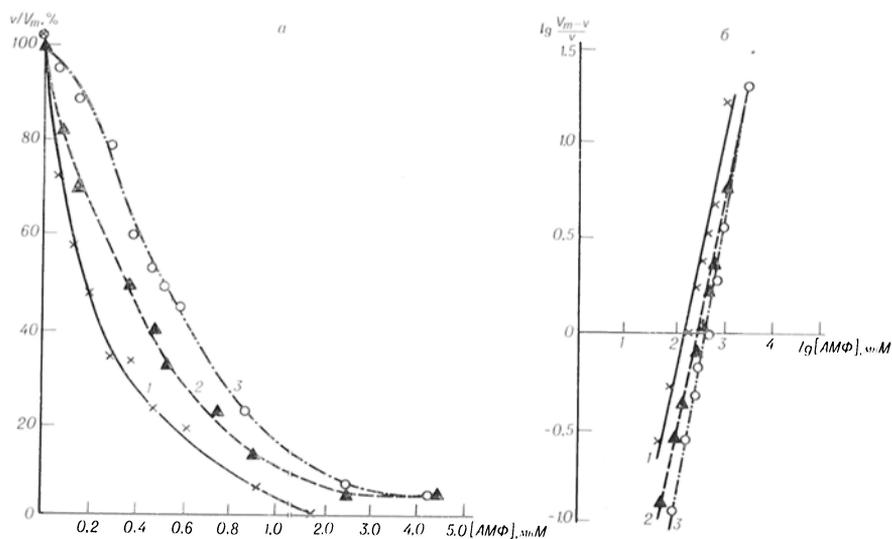


Рис. 2. Влияние ацетилсалицилата на чувствительность к ингибированию АМФ фруктозо-1,6-бисфосфатазы из скелетных мышц кролика в обычных координатах (а) и координатах Хилла (б).

1 — без ацетилсалицилата, 2 и 3 — концентрации ацетилсалицилата 9 и 18 мМ соответственно.

несмотря на существенные различия в чувствительности к ингибированию АМФ проявляют одинаковую чувствительность к десенситизирующему действию двух исследованных соединений, из которых салицилат оказался более эффективным, чем ацетилсалицилат.

Наши данные согласуются с точкой зрения Маркуса [7] о том, что салицилат, связываясь в аллостерическом центре фермента, препятствует связыванию АМФ, но сам при этом не вызывает тех конформационных изменений молекулы фермента, которые приводят к ингибированию его активности.

По данным Хапа и соавт. [5], дейст-

Влияние ацетилсалицилата на регуляторные свойства фруктозо-1,6-бисфосфатазы из печени и скелетных мышц кролика

Источник фермента	Концентрация ацетилсалицилата, мМ	$[I]_{0,5}$, мМ	h
Печень кролика	0	9	2,3
	5	13	2,3
	15	18	1,6
	25	31	1,2
Скелетные мышцы кролика	0	0,20	1,6
	9	0,37	1,3
	18	0,50	1,3

Примечание. Величины $[I]_{0,5}$ и h рассчитаны из данных рис. 1 и 2.

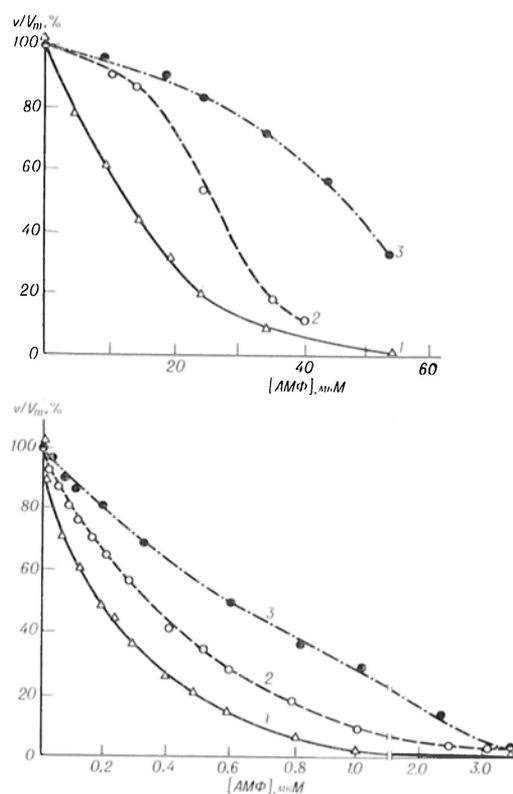


Рис. 3. Сравнение десенситизирующего действия ацетилсалицилата и салицилата на фруктозо-1,6-бисфосфатазу из печени (а) и скелетных мышц (б) кролика.

(верхний рис.): кривая 1 — в отсутствие салицилатов, 2 — 13 мМ ацетилсалицилата Na, 3 — 13 мМ салицилата Na. (нижний рис.): 1 — в отсутствие салицилатов, 2 — 15 мМ ацетилсалицилата Na, 3 — 15 мМ салицилата Na.

вие салицилата на фруктозо-1,6-бисфосфатазу легко обратимо, в то время как эффект ацетилсалицилата необратим, что объясняется, вероятно, образованием N-ацетильной связи с одним из аминокислотных остатков в области аллостерического центра фермента. Полученные нами данные о более слабом десенситбилизирующем действии ацетилсалицилата, чем салицилата, могут свидетельствовать о том, что ацетилирование не затрагивает тех аминокислотных остатков, которые непосредственно участвуют в проявлении ингибирующего действия АМФ, а также о том, что ацетильная группа мешает связыванию аспирина в аденозинсвязывающем центре фермента.

Фруктозо-1,6-бисфосфатаза вместе с фосфофруктокиназой составляют субстратный цикл фруктозо-6-фосфат/фруктозо-1,6-дифосфат, который регулирует поток углеводов по пути гликолиза или глюконеогенеза. Одновременное функционирование этих ферментов будет приводить к рассеиванию энергии гидролиза АТФ в виде тепла, что при длительном функционировании цикла с высокой скоростью может вызвать гипертермию [9]. В физиологических условиях этот цикл является объектом тонкой регуляции, которая в настоящее время интенсивно исследуется [11, 12]. Пилкис и соавт. [12] полагают, что активация глюконеогенеза в печени глюкагоном осуществляется путем индуцирования цАМФ-зависимого фосфорилирования 6-фосфофрукто-2-киназы, что приводит к снижению концентрации фруктозо-2,6-дифосфата, являющегося аллостерическим активатором фосфофруктокиназы и ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Результатом этого являются снижение потока углеводов через фосфофруктокиназу и усиление потока через фруктозо-1,6-бисфосфатазу, что приводит к стимуляции синтеза глюкозы.

Нами получены данные о том, что ацетилсалицилат оказывает значительное ингибирующее действие на фосфофруктокиназу из скелетных мышц кролика [1]. Таким образом, действие ацетилсалицилата на фосфофруктоки-

назу и фруктозо-1,6-бисфосфатазу является реципрокным, что может вести к усилению потока углеводов на уровне субстратного цикла в сторону биосинтеза глюкозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вайсберг Е. Ф., Беляева Н. Ф., Глинка Е. Ю. и др. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии, 4-й. Тезисы докладов. Алма-Ата, 1983, с. 51.
2. Никулин И. Р., Беляева Н. Ф., Каган З. С. — Вopr. мед. химии, 1983, № 4, с. 128—131.
3. Blake C. C. F., Evans P. R. — J. molec. Biol., 1974, vol. 84, p. 585—601.
4. Einarsson R., Eklund H., Zeppezauer E. et al. — Europ. J. Biochem., 1974, vol. 49, p. 41—47.
5. Han P. F., Han G. Y., MeBay H. C., Johnson J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, vol. 85, p. 747—755.
6. Hers H. G., Hue L. — Ann. Rev. Biochem., 1983, vol. 52, p. 617—653.
7. Marcus F. — FEBS Lett., 1976, vol. 70, p. 159—162.
8. Mizunuma H., Tashima Y. — Arch. Biochem., 1982, vol. 217, p. 512—516.
9. Newsholm A., Brand K., Lang J. et al. — Biochem. J., 1979, vol. 182, p. 621—624.
10. Pai E. F., Sachsenheimer W., Schirmer R. H., Schulz G. E. — J. molec. Biol., 1977, vol. 114, p. 37—46.
11. Phillips T. L., Talent J. M., Gracy R. W. — Biochem. biophys. Acta, 1976, vol. 429, p. 624—628.
12. Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., McGrawne M. et al. — Molec. cell. Endocr., 1982, vol. 25, p. 245—266.
13. Price N. C., Lyon S. J. — Gen. Pharmacol., 1981, vol. 12, p. 365—368.

Поступила 05.05.85

ACETYSALICYLATE AND SALICYLATE DESENSITIZE RABBIT LIVER AND SKELETAL MUSCLE FRUCTOSE 1,6-BIPHOSPHATASE TO ALLOSTERIC AMP INHIBITION

N. F. Belyaeva, E. Yu. Glinka,
I. R. Nikulin, Z. S. Kagan

Institute for Biological Testing of Chemical
Compounds, Cupavna, Moscow Region

Acetylsalicylate and salicylate partially desensitized fructose 1,6-biphosphatase from rabbit liver and skeletal muscle to allosteric AMP inhibition. The desensitization was accompanied by a decrease in cooperativity between allosteric sites especially distinct for the liver isoenzyme. The effect of salicylate on both isoenzymes was more pronounced than that of acetylsalicylate. No essential differences in the effect of the compounds studied on these isoenzymes were found.