

ТАРТУСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Т.Э.Вихалемм

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ОСНОВНЫХ
СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ И АДЕНОЗИН-
ТРИФОСФАТАЗЫ (АТФ азы) В СУБКЛЕТОЧНЫХ
ФРАКЦИЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Diss. Tart. 400230

ТАРТУ 1971

На правах рукописи

Т.Э.Вихалемм

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ОСНОВНЫХ
СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ И АДЕНОЗИН-
ТРИФОСФАТАЗЫ (АТФ азы) В СУБКЛЕТОЧНЫХ
ФРАКЦИЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

03. 093 - биологическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре биологической химии и Проблемной научно-исследовательской лаборатории биохимии секреторных процессов медицинского факультета Тартуского государственного университета

Диссертация написана на эстонском языке, оригинальное заглавие работы: "Põhiliste seedefermentide ja adenosiinrifosfataasi (ATPaasi) jaotumisest ning mõnedest omadustest pankrease subtsellulaarsetes fraktsioonides". Она содержит 213 страниц машинописи, включая 24 таблицы и 45 рисунков

Научный руководитель - кандидат медицинских наук, доцент
Л. Я. Т я х е п ы л ь д

Научный консультант - кандидат биологических наук,
доцент Х. П. Л и н д

Официальные оппоненты:

член-корр. АН Эст.ССР, доктор медицинских наук
профессор И. К. С и б у л ь

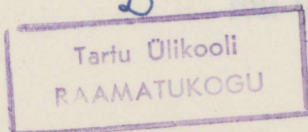
кандидат химических наук, младший научный
сотрудник А. А. А а в и к с а а р

Ведущее учреждение: Институт экспериментальной и клинической медицины Министерства Здравоохранения Эстонской ССР

Автореферат разослан "21" ^{мая} 1971 г.

Защита состоится "22" ^{июня} 1971 г. на
Заседании Совета медицинского факультета Тартуского
государственного университета, г.Тарту, ул.Юликооли, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке
Тартуского государственного университета



486848

M. Maaroos
(И. Маароос)
Ученый секретарь ТГУ

Внешнесекреторная деятельность поджелудочной железы представляет собой сложный и комплексный процесс, характеризующийся определенными качественными и количественными особенностями по сравнению с деятельностью других пищеварительных желез и экскреторных органов и тканей.

Физиологические аспекты панкреатической секреции, в частности закономерности выделения панкреатического сока и его химического состава в связи с секреторной деятельностью поджелудочной железы, привлекали постоянное внимание и нашли систематическую разработку со стороны как отечественных (Павлов, 1897; Разенков, 1946; Скляр, 1958; Соловьев, 1959; Богач и др., 1960; Уголев, 1961; Кяэр-Кингисепп и др., 1964, 1968; Теэсалу, 1965 и др.), так и зарубежных (Babkin, 1950/Бабкин, 1960/; Thomas, 1950; Junqueira, Hirsch, 1956; Dreiling, Janowitz, 1959; Palade et al., 1962; Desnuelle, 1966; Hokin, 1967; Preshaw, 1967; Dupré, 1970 и др.) исследователей.

В то же время многие вопросы механизма панкреатической секреции, представляющие более общепроизводственный интерес, стали за последние 10-15 лет объектом исследований для современной биохимии, биофизики и молекулярной биологии. С этой точки зрения внимание уделялось прежде всего тому, что во внешнесекреторной части поджелудочной железы, в соответствии с ее особой ролью в обеспечении пищеварения в целом, происходит исключительно интенсивный биосинтез набора "экспортных" гидролитических ферментов, сопряженный с наличием в этой пищеварительной железе высокого уровня обменных и энергетических процессов (Junqueira et al., 1957; Хесин, 1960; Palade et al., 1962; Caro, Palade, 1964; Линд и др., 1966; Desnuelle, 1966; Hokin, 1967; Bauduin et al.,

1969). В силу этих особенностей поджелудочная железа заслуживает особого внимания в качестве объекта исследования современной актуальной проблемы биосинтеза белков и его регуляции в высших организмах.

Вместе с тем в ходе углубленных исследований в области сложных механизмов биосинтеза белков, в частности также биосинтеза секреторных ферментов в поджелудочной железе, было установлено, что местом окончательного формирования вновь синтезированных белковых молекул в секреторной клетке являются рибосомы, образующие в ассоциации с мембранами эндоплазматический ретикулум (Siekevitz, Palade, 1960; Palade et al., 1962; Хирш, 1963; Schramm, 1967). Этот факт, в свою очередь, поднял вопросы о внутриклеточном транспорте вновь синтезированных на рибосомах ферментов (зимогенов) через мембраны клеточных структур в полость желез, в состав панкреатического сока, о выделении в кишечник и включении после активирования в химизм пищеварения.

Если в изучении механизмов активирования и действия секреторных, в особенности протеолитических ферментов, благодаря расшировке их химической структуры, достигнуты заметные успехи (Hartley, 1965; Keil, 1968; Perutz, 1969), то проблемы их распределения и внутриклеточного транспорта остались до сих пор дискуссионными и полностью нерешенными. В частности, на основании систематических электронномикроскопических и радиоавтографических исследований (Siekevitz, Palade, 1958^a; 1958^b; Palade et al., 1962; Jamieson, Palade, 1967^a; 1967^b) была предложена широко признанная гипотеза (Caro, Palade, 1964), согласно которой синтезированные на рибосомах ферменты транспортируются вдоль внутриклеточных канальцев, минуя цитоплазму, в аппарат Гольджи, где они включаются в состав секреторных гранул, открывающихся затем в ходе секреции в просвет железы. В то же время биохимические исследования относительно распределения секреторных ферментов в субклеточных фракциях поджелудочной железы (Laird, Barton, 1958; Redman, Hokin, 1959; Morris, Dickman, 1960; Arnesjö, Grubb, 1969) обнаружили наличие их

в значительных количествах в растворимой фракции. Это послужило основанием к альтернативному представлению, согласно которому в процессе внутриклеточного транспорта вновь синтезированных ферментов в секреторных клетках поджелудочной железы участвует также цитоплазма. При этом необходимо подчеркнуть, что результаты исследования распределения основных секреторных ферментов по субклеточным фракциям и структурам поджелудочной железы остаются у различных авторов до настоящего времени разными и даже противоречивыми, особенно при сопоставлении гистохимических и радиоавтографических данных с биохимическими.

В исследованиях процесса активного транспорта веществ через биологические мембраны и его энергетики, представляющего наряду с биосинтезом белков одну из наиболее актуальных общепромеисловических проблем, особое внимание в последнее время уделяется АТФазной системе. Это направление получило свое начало в классических работах Энгельгардта и Любимовой (1939), установивших, что сам сократительный белок мышечных волокон — миозин — обладает АТФазной активностью, чем и обеспечивается освобождение энергии макроэргических фосфатных связей АТФ для мышечного сокращения. С открытием Скоу (Skou, 1957) особой Na^+ - K^+ -активируемой (транспортной) АТФазы в мембранной фракции периферического нерва краба, а также на основании результатов многочисленных последующих работ о связи этого фермента с активным транспортом одновалентных катионов и других низкомолекулярных веществ возникло и укрепилось представление о том, что АТФазная система является существенным энзиматическим звеном в активном мембранном транспорте и его энергетической обеспеченности (Skou, 1965; Лисовская, 1967; Whittam, Wheeler, 1970).

Следует отметить, однако, что в то время как особенности распределения, свойств и механизма действия АТФазной системы подвергались систематическому исследованию во многих тканях и органах, характеристике АТФазной системы и ее возможной роли в панкреатической секреции уделено чрезвычайно мало внимания.

Учитывая вышеизложенные особенности в современном состоянии изучения биохимических аспектов панкреатической секреции, сформулированы основные задачи настоящей работы:

- 1) изучить биохимическими методами распределения активности основных секреторных ферментов (протеаз, амилазы и липазы) в первичных субклеточных фракциях поджелудочной железы, выделенных дифференциальным центрифугированием;
- 2) выяснить наличие и распределение АТФазной системы в тех же субклеточных фракциях;
- 3) изучить особенности влияния одно- и двухвалентных катионов на АТФазную активность поджелудочной железы с уделением особого внимания выяснению характера влияния ионов Са, играющих существенную роль в панкреатической секреции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проводились на взрослых собаках и кошках обоего пола. После 24-часового голодания кошек декалтировали, а собаки умерщвлялись под эфирным наркозом обескровливанием с одновременным промыванием кровеносного русла охлажденным физиологическим раствором через канюли, введенные в яремные вены. Затем у животных быстро удаляли поджелудочную железу, промывали ее охлажденным физиологическим раствором, очищали от соединительнотканых оболочек и размельчали. Гомогенизирование проводилось на холоде в 0,32 М растворе сахарозы (в разведении 1:9) при рН 5 и при наличии 5 мМ ЭДТА. Полученный гомогенат подвергался дифференциальному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге ЦЛР-1 и VAC-60 по методу Хокина (Hokin, 1955) с удалением ядерной фракции и с последующим отделением сначала фракции секреторных гранул и митохондрий, а затем микросомальной и растворимой фракций. Электронномикроскопический контроль полученных фракций показал, что фракции как митохондрий, так и секреторных гранул гетерогенны, в связи с чем их объеди-

нили в суммарную фракцию секреторных гранул и митохондрий. В то же время микросомальная фракция содержала лишь единичные митохондрии и была лишена секреторных гранул. В выделенных клеточных фракциях - растворимой, микросомальной и фракции митохондрий и секреторных гранул - проводилось изучение сравнительного распределения протеолитической, амилазной, липазной, а также АТФазной активности. При этом распределение активности секреторных ферментов изучали только у собак и в двух сериях, отличающихся между собой по обработке субклеточных фракций и по способу выражения активности ферментов. В первой серии протеазную, амилазную и липазную активность определяли непосредственно во фракциях, полученных после регомогенизирования первичных осадков микросом и секреторных гранул-митохондрий в 0,32 М растворе сахарозы, и выражали в единицах данного фермента на гомогенат или на соответствующую фракцию (обозначена условно как "общая" активность). С целью получения более наглядного представления о распределении ферментов по субклеточным фракциям, в этой серии опытов вычисляли также общую активность ферментов субклеточных фракций в процентах от общей активности гомогената, принятой за 100%.

Во второй серии опытов первичные осадки секреторных гранул-митохондрий и микросом регомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы, содержащем 0,033% дезоксихолата натрия. Активность ферментов определяли через 60 мин после регомогенизирования и выражали в единицах данного фермента на мг белка соответствующей субклеточной фракции (удельная активность).

Исследования по распределению и свойствам АТФазной активности субклеточных фракций поджелудочной железы проводили как на собаках, так и на кошках и активность фермента выражали в единицах специфической активности.

Количество белка в субклеточных фракциях определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Суммарную протеолитическую активность в гомогенатах и субклеточных фракциях поджелудочной железы определяли по

методу Чарней и Томарелли (Charney, Tomarelli, 1947), применимость которого для гетерогенных систем доказали Суринов и Манойлов (1965).

С целью активирования протеолитических ферментов, находящихся в секреторной клетке и ее структурах в виде неактивных проферментов, субклеточные фракции перед определением протеазной активности обрабатывали раствором трипсина в 0,001 н растворе HCl, содержащем 0,24 г NaCl и 0,11 г CaCl₂ в 1 л (Desnuelle, Rovey, 1962).

В качестве субстрата при определении протеолитической активности применяли азоказеин, приготовленный нами нитрированием казеина. Пригодность этого препарата для подобных исследований подтверждалась линейностью интенсивности освобождавшего азокрасителя при увеличении количества трипсина до 1000 мкг/мл в стандартной инкубационной смеси.

Протеазную активность определяли в реакционной смеси, содержащей 1 мл соответствующей субклеточной фракции (количество белка от 80 до 350 мкг/мл) и 1 мл 1%-ного раствора азоказеина в 0,5%-ном растворе NaHCO₃ (pH 8,5). После инкубирования смеси в течение 30 мин в водяном термостате при 37⁰С оставшиеся белки осаждали добавлением ТХУ и в фильтрате определяли интенсивность азокраски на фотоэлектроколориметре ФЭК-М при 430 нм.

За единицу протеолитической активности было принято количество фермента, вызывающее в течение 1 мин увеличение оптической плотности при 430 нм на 0,01 единицу (Суринов, Манойлов, 1965).

Амилазную активность определяли фотометрическим измерением количества продуктов гидролиза крахмала (Smith, Roe, 1949).

Инкубационная смесь состояла из 5 мл 1,2%-ного (во II серии опытов - 1,5%-ного) раствора крахмала, 1 мл 0,5 н раствора NaCl, 3 мл 0,01 М К,Na-фосфатного буфера (pH 7,2) и 1 мл ферментного препарата (100 - 300 мкг/мл). После инкубирования при 37⁰С в течение 30 минут реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 н HCl, и количество негидролизиро-

ванного крахмала определяли по интенсивности йодной реакции на электрофотокориметре ФЭК-М при 620 нм. За единицу амилазной активности было принято количество фермента, гидролизующего в течение 1 мин 0,33 мг крахмала до продуктов, не вызывающих после прибавления йода увеличения оптической плотности при 620 нм (Smith, Roe, 1949).

Липазную активность, ввиду ее лабильности, определяли непосредственно после получения субклеточных фракций. В качестве субстрата использовали оливковое масло (Marchis-Mouren et al., 1959), а в качестве эмульгатора и активатора - дезоксихолат натрия (Moerloose, Ruysen, 1962; Moerloose, 1963; Melzer, Lazo-Wasem, 1964). Перед определением липазной активности из смеси, содержащей 30 мл оливкового масла, 165 мл 0,01 М трис-НСI буфера (рН 8,0), 5 мл 1%-ного раствора дезоксихолата натрия и 15 г размельченного льда, готовили эмульсию путем гомогенизирования при 1500 об/мин в течение 15 мин.

В инкубационную среду брали 10 мл вышеописанной эмульсии, к которой добавляли 1 мл соответствующей субклеточной фракции. Во избежание протеолиза липазы инкубирование проводили при 30°C в течение 1 часа (Moerloose, Ruysen, 1962). Реакцию останавливали добавлением 20 мл этанола и количество освобожденных жирных кислот определяли титрованием 0,001 н раствором NaOH с применением в качестве индикатора фенолфталеина.

За единицу липазной активности было принято количество фермента, освобождающее из эмульсии оливкового масла при инкубации в данных условиях опыта в течение 1 мин 10 мк-экв кислоты (Marchis-Mouren et al., 1959).

АТФазную активность в субклеточных фракциях поджелудочной железы изучали в связи с наличием в инкубационной среде одно- и двухвалентных катионов в виде хлористых солей в следующих конечных концентрациях: Na^+ - 100 мМ, K^+ - 20 мМ, Mg^{2+} - 3 мМ и Ca^{2+} - 1-3 мМ. Помимо ионов, в инкубационную смесь (общий объем 1 мл) входили 3 мМ АТФ, 30 мМ трис-НСI (рН 7,4 при наличии ионов Mg, Na и K; рН 8,4 при

наличии ионов Са) и 1 мМ ЭДТА. Инкубирование проводили в водяном термостате при 30°C в течение 20 мин (в кинетических исследованиях при наличии ингибитора - АДФ время инкубирования сокращали до 10 мин), после чего белки осаждали прибавлением 0,5 мл 20%-ного раствора ТХУ и в безбелковом фильтрате определяли неорганический фосфор методом Фиске и Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925) с использованием в качестве восстановителя насыщенного раствора тиомочевины (Мартинсон, Виллако, 1961).

За единицу АТФазной активности было принято количество фермента, освобождающего путем гидролиза АТФ в течение 1 мин 1 мкмоль неорганического фосфора. Активность АТФазы выражали в единицах фермента на мг белка соответствующей субклеточной фракции (удельная активность).

В кинетических исследованиях АТФазы использовался ферментный препарат, полученный от микросомальной фракции поджелудочной железы после ее обработки 0,1%-ным раствором дезоксихолата натрия в течение 1 часа, регомогенизирования и удаления нерастворимых мембранных частиц центрифугированием при 25000 г в течение 1 часа. Пробы ферментного препарата инкубировали с различными концентрациями ионов Са (от 0,01 до 3 мМ), АТФ (от 1 до 3 мМ) и АДФ (0,70, 1,25 и 2,0 мМ). В опытах с изучением десенсibilизирования ферментные препараты преинкубировались при наличии мочевины (конечная концентрация 0,7 М) в течение 1 часа.

За основу при оценке наличия кооперативных взаимодействий субстрата (АТФ), активатора (ионов Са) или ингибитора (АДФ) с панкреатической АТФазой было принято уравнение Хилла (Squires, 1965): $\log \left(\frac{V}{V_M} - 1 \right) = \log k - n \log S$, где V - найденная скорость; V_M - максимальная скорость; S - концентрация субстрата (а также активатора и ингибитора); k - концентрация субстрата (активатора, ингибитора), при которой $V = \frac{V_M}{2}$; n - коэффициент Хилла.

На основании этого уравнения и экспериментальных данных сопоставлением логарифма $\frac{V}{V_M} - 1$ и логарифма концентрации субстрата (активатора, ингибитора) строили графики

Хилла и по тангенсу наклона полученных прямых находили коэффициента Хилла (n). В литературе принято (Monod et al., 1963), что если $n > 1$, то имеют место кооперативные взаимодействия эффектора с двумя или большими связывающими центрами в молекуле аллостерических ферментов, а при $n = 1$ такая кооперативность отсутствует.

Результаты исследований подвергнуты статистической обработке. Степень достоверности различий между результатами отдельных групп опытов (p) определялась по t -критерию для малых выборок (Батунер, Позин, 1963).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Распределение протеазной, амилазной и липазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы собак

I. Распределение протеазной активности

Наши исследования показывают (табл. I), что протеазной активностью обладают как гомогенаты, так и субклеточные фракции поджелудочной железы собак. В то же время внимания заслуживает факт, что результаты сравнительного распределения протеазной активности по отдельным субклеточным фракциям зависят от способа выражения ферментативной активности. Наиболее высокой общей протеазной активностью, составляющей 33,5% общей активности гомогената, обладала растворимая фракция (табл. I A), несколько меньше протеазной активности мы нашли (26,6%) во фракции секреторных гранул и митохондрий и значительно меньше (11,1%) - в микросомальной фракции.

В то же время по удельной активности протеаз (табл. I B) первое место занимает фракция секреторных гранул и митохондрий ($2,80 \pm 0,99$), примерно такая же удельная активность ($2,40 \pm 0,36$) была найдена в микросомальной и наиболее низкая ($1,12 \pm 0,14$) - в растворимой фракции. При этом сле-

Таблица I

Распределение протеазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы собак

А. Общая активность (единиц во фракции)								
№ опыта	Гомогенат		Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция	
	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%
1	732	100	290	39,6	40	5,5	332	45,3
2	1820	100	477	26,2	267	14,7	1120	61,5
3	716	100	184	27,5	40	5,6	153	21,4
4	798	100	192	24,2	121	15,3	122	15,5
5	9000	100	1410	15,7	1285	14,3	2153	24,0
Среднее				26,6		11,1		33,5
Б. Удельная активность (единиц/мг белка)								
№ опыта	Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция			
1	1,15		1,46		0,58			
2	1,68		0,82		0,27			
3	3,54		2,23		1,16			
4	3,04		2,94		0,88			
5	4,37		2,63		1,12			
6	2,48		4,05		1,68			
7	3,61		3,67		1,26			
8	2,23		1,29		1,60			
9	2,61		1,68		1,75			
10	3,33		3,71		0,89			
Среднее	2,80±0,99		2,40±0,36		1,12±0,14			

дует отметить, что наиболее высокое содержание белка было найдено в растворимой фракции - 40-200 мкг/мл (во фракции секреторных гранул и митохондрий - 15-60 мкг/мл, во фракции микросом - 10-40 мкг/мл).

Хотя в отдельных опытах как общая, так и удельная протеазная активность колебалась в довольно больших пределах, что связано, по-видимому, с индивидуальными особенностями подопытных животных, описанные соотношения сравнительного распределения протеаз по субклеточным фракциям сохранились во всех опытах.

2. Распределение амилазной активности

Как при изучении распределения протеазной активности, так и при определении активности амилазы сравнительные результаты находились в известной степени в зависимости от способа выражения активности фермента (табл. 2). Подавляющее большинство общей активности амилазы (77,6% общей активности гомогената) было найдено в растворимой фракции (табл. 2 А). Гораздо меньшей амилазной активностью обладали фракции секреторных гранул и митохондрий (11,8%), в особенности, фракция микросом (4,8%).

С другой стороны, удельная активность амилазы (табл. 2 Б) оказалась приблизительно одинаковой в растворимой фракции ($18,0 \pm 3,7$) и во фракции секреторных гранул и митохондрий ($19,8 \pm 3,4$), в микросомальной фракции ($8,1 \pm 1,7$) она была значительно ниже.

3. Распределение липазной активности

Общие закономерности, установленные при сравнительном распределении протеазной и амилазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы собак, еще более наглядно подтвердились при изучении распределения липазной активности (табл. 3). Как видно из табл. 3 А, наиболее высокой общей активностью липазы обладала растворимая фрак-

Таблица 2

Распределение амилазной активности в субклеточных
фракциях поджелудочной железы собак

А. Общая активность (единиц во фракции)								
№ опыта	Гомогенат		Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция	
	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%
1	3522	100	254	7,3	130	3,7	3054	86,5
2	9165	100	1140	12,4	486	5,3	7200	78,5
3	2724	100	244	9,0	66	3,0	1647	60,0
4	2340	100	490	20,8	152	6,4	1535	65,4
5	2623	100	247	9,4	143	5,5	1728	65,6
Среднее				11,8		4,8		77,6
Б. Удельная активность (единиц/мг белка)								
№ опыта	Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция			
1		10,9		1,4		4,8		
2		18,6		4,2		6,4		
3		29,0		7,4		-		
4		27,0		2,6		19,2		
5		39,6		13,9		13,4		
6		20,6		10,4		25,3		
7		27,3		19,6		34,8		
8		4,7		1,9		13,3		
9		9,7		9,7		27,2		
10		11,9		9,8		-		
Среднее		19,8±3,4		8,1±1,7		18,0±3,7		

Таблица 3

Распределение липазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы собак

А. Общая активность (единиц во фракции)								
№ опыта	Гомогенат		Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция	
	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%
1	123,0	100	26,4	21,5	11,5	9,3	40,8	33,3
2	81,3	100	10,5	13,0	6,4	7,9	36,8	45,3
3	126,5	100	27,7	21,9	11,5	9,0	33,7	30,2
4	227,2	100	56,3	20,4	21,6	8,1	146,0	52,8
5	400,0	100	88,2	22,0	34,7	8,7	217,8	42,0
Среднее				19,8		8,6		40,7
Б. Удельная активность (единиц/мг белка)								
№ опыта	Фракция секреторных гранул и митохондрий		Микросомальная фракция		Растворимая фракция			
1		2,4		1,4		0,6		
2		3,3		3,3		2,4		
3		2,7		2,0		1,3		
4		4,6		3,2		2,6		
5		7,6		5,2		1,8		
6		6,3		1,8		1,9		
7		3,8		3,7		2,5		
8		5,6		1,9		2,5		
9		3,9		2,1		1,5		
10		1,7		0,8		0,8		
Среднее		4,1±0,5		2,5±0,4		1,8±0,2		

ция (40,7% общей активности гомогената), примерно в 2 раза меньше этого фермента во фракции секреторных гранул и митохондрий (19,8%) и еще меньше в микросомальной фракции (8,6%).

Однако по удельной активности липазы (табл. 3 Б) первое место занимала фракция секреторных гранул и митохондрий ($4,1 \pm 0,5$), меньше липазы в микросомальной фракции ($2,5 \pm 0,4$) и наиболее низкой липазной активностью обладала растворимая фракция ($1,8 \pm 0,2$).

4. О возможностях дальнейшего разделения секреторных ферментов растворимой фракции поджелудочной железы собаки

Нами проводилось сравнительное исследование разделения изученных секреторных ферментов растворимой фракции поджелудочной железы собак при помощи хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (12 опытов), СМ-целлюлозе (12 опытов) и гельфильтрации на сефадексе G-100 (9 опытов).

Как видно из рис. 1, растворимая фракция поджелудочной железы собаки разделялась на ДЭАЭ-целлюлозе на 7 белковых фракций, из которых I обладала амилазной, IV и V - протеазной и III - ингибиторной в отношении трипсина активностью. Липазной активности не удалось обнаружить ни в одной разделенной белковой фракции.

При помощи хроматографии на СМ-целлюлозе растворимая фракция поджелудочной железы разделялась на 3 белковых фракции (рис. 2), из которых I и II обладали протеазной активностью. И в этом случае в разделенных белковых фракциях не удалось обнаружить наличия липазы.

Хорошее разделение белковых фракций с сохранением их ферментативной активности было получено в опытах с применением гельфильтрации через сефадекс G-100. Как видно из рис. 3, растворимая фракция поджелудочной железы разделялась в большинстве случаев на 5 четких белковых фракций, только в некоторых опытах I и II фракции имели тенденцию

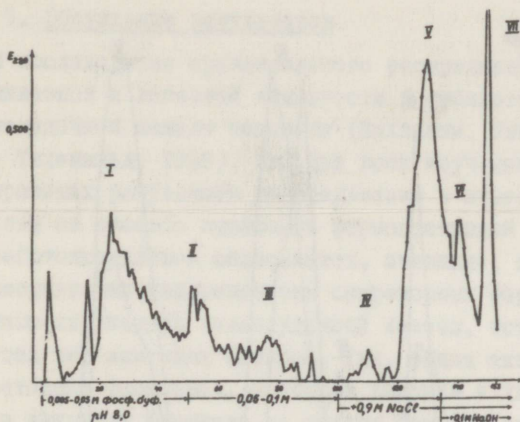


Рис. 1. Хроматограмма разделения белков растворимой фракции поджелудочной железы собаки на ДЭАЭ-целлюлозе

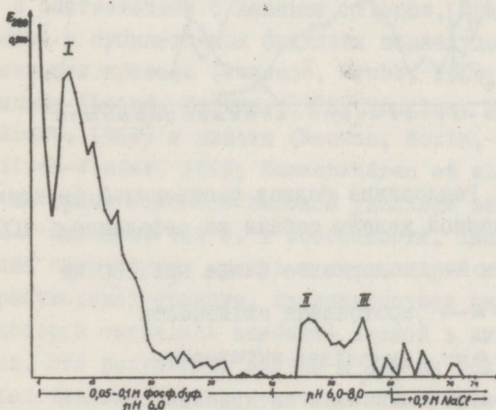


Рис. 2. Хроматограмма разделения белков растворимой фракции поджелудочной железы собаки на СМ-целлюлозе

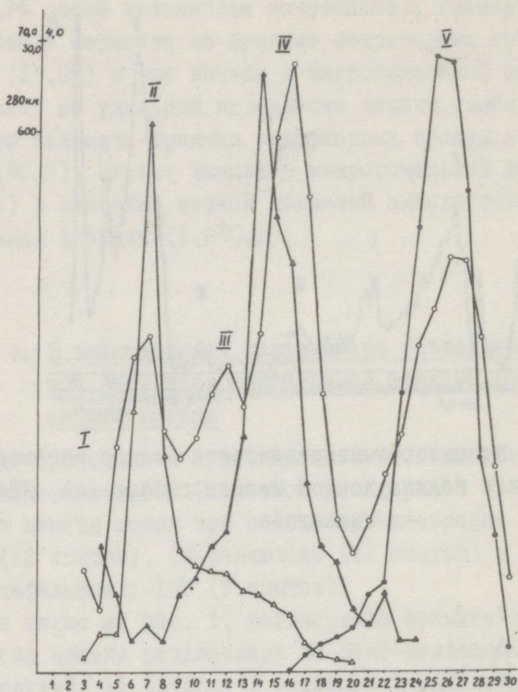


Рис. 3. Разделение белков растворимой фракции поджелудочной железы собаки на сефадексе G-100

- содержание белка при 280 нм
- ▲—▲— протеазная активность
- амилазная активность
- △—△— липазная активность

к слиннию с III фракцией. Исследования ферментативной активности в полученных фракциях показали, что протеазы сосредоточены в IV, амилаза в V, липаза во II и рибонуклеаза в III фракциях.

5. Обсуждение результатов

Наши исследования сравнительного распределения протеазной, амилазной и липазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы показали (Вихалемм, Линд, 1967; Вихалемм, Тяхепыльд, 1968), что при всех изученных секреторных ферментах результаты распределения в известной степени зависят от способа выражения ферментативной активности. Этим обстоятельством объясняются, очевидно, и противоречия в результатах распределения секреторных ферментов по субклеточным структурам поджелудочной железы, встречающиеся в работах тех или иных авторов. Так, общая активность всех секреторных ферментов, особенно амилазы и липазы (выраженная в единицах фермента на данную фракцию или в процентах общей активности гомогената), оказалась наиболее высокой в растворимой фракции, заметно менее высокой во фракции секреторных гранул и митохондрий и сравнительно низкой в микросомальной фракции. Представленные результаты находятся в соответствии с данными авторов, приводивших распределение в субклеточных фракциях поджелудочной железы общей активности протеаз (Arnesjö, Grubb, 1969; Rothman, 1970), амилазы (Laird, Barton, 1958; Douglas, Munzo, 1959; Arnesjö, Grubb, 1969) и липазы (Redman, Hokin, 1959; Arnesjö, Filipek-Wender, 1968; Ramachandran et al., 1970).

В то же время наиболее высокой удельной активностью как протеаз и амилазы, так и, в особенности, липазы обладает фракция секреторных гранул и митохондрий и наиболее низкой — растворимая фракция, за исключением амилазы, активность которой оказалась наиболее низкой в микросомальной фракции. Эти результаты близки к данным тех работ, в которых представлена удельная активность протеаз (Hokin, 1955; Arnesjö, Grubb, 1969) и амилазы (Siekevitz, Palade, 1958; Douglas, Munzo, 1959; Arnesjö, Grubb, 1969) в субклеточных фракциях поджелудочной железы.

При анализе результатов, полученных в настоящей работе, в сопоставлении с имеющимися в литературе данными по внутриклеточному распределению секреторных ферментов в

поджелудочной железе (Douglas, Munzo, 1959; Arnesjö, Grubb, 1969; Alaniz et al., 1970; Rothman, 1970) возникает вопрос: что лежит в основе противоречий в результатах внутриклеточного распределения секреторных ферментов поджелудочной железы при определении их общей и удельной активности, и какой способ выражения ферментативной активности считать наиболее подходящим и обоснованным при таких сравнительных исследованиях?

Прежде всего необходимо отметить, что в биохимических исследованиях в ходе гомогенизирования ткани и выделения субклеточных фракций часть секреторных гранул может разрушаться, вследствие чего ферментативная активность в растворимой фракции увеличивается. Вместе с тем, как показали наши опыты (Вишалеми, Линд, 1967), после обработки фракции секреторных гранул и митохондрий и микросомальной фракции общая активность секреторных ферментов, в особенности протеаз и амилазы в этих фракциях увеличивается, что свидетельствует о сохранении ферментативной активности в структурных компонентах клетки и после их выделения.

В связи с этим можно полагать, что в наших опытах одной из причин высокой удельной активности секреторных ферментов во фракции секреторных гранул и митохондрии и во фракции микросом могла бы быть именно обработка их дезоксихолатом, способствующим выходу ферментов из этих структурных компонентов клетки и тем самым доступности к субстрату, вследствие чего и была там найдена более высокая удельная активность по сравнению с общей активностью, когда детергент не применялся. Однако известно, что амилаза полностью освобождается при рН 6-7 (Hokin, 1955), т.е. при рН среды инкубирования при определении общей активности без обработки детергентом, а при определении общей активности липазы дезоксихолат натрия в наших опытах вошел в состав эмульсии субстрата. Эти факты позволяют заключить, что предварительную обработку структурных компонентов клетки детергентом при определении удельной активности секреторных ферментов в наших опытах нельзя считать единствен-

ной причиной противоречий общей и удельной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы, в частности при определении амилазы и липазы.

С другой стороны, как показали наши определения (Ви-халемм, Тяхепылд, 1968), а также другие работы (Arnesjö, Grubb, 1969; Rothman, 1970), растворимая фракция содержит в 3-5 раз больше белка, чем другие субклеточные фракции, следовательно и больше неспецифических белков, не обладающих активностью секреторных ферментов. Возможно, что в этом может заключаться одна из существенных причин наличия низкой удельной активности изученных секреторных ферментов в растворимой фракции по сравнению с другими субклеточными фракциями, в частности, с фракцией секреторных гранул, в которой доля неспецифических белков, видимо, ниже, чем в растворимой фракции.

Таким образом, исходя из наших результатов и учитывая соображения литературы последних лет (Arnesjö, Grubb, 1969; Rothman, 1970; Ramachandran et al., 1970), можно допустить, что для сравнительной характеристики распределения секреторных ферментов в гомогенатах или внутриклеточных структурах поджелудочной железы наиболее адекватным представляется определение их общей активности по сравнению с определением удельной активности.

В связи с этим следует отметить, что систематически развиваемая и широко признанная гипотеза о ведущей роли секреторных гранул во внутриклеточном транспорте секреторных ферментов поджелудочной железы без их выхода в цитоплазму (Siekevitz, Palade, 1958; Palade et al., 1962; Caro, Palade, 1964; Jamieson, Palade, 1967^a; 1967^b; 1968) базируется на радиоавтографических данных и, в частности, на биохимических результатах сравнительно высокой удельной активности этих ферментов в секреторных гранулах и низкой удельной активности в цитоплазме.

На самом же деле в растворимой фракции общая активность секреторных ферментов, особенно амилазы и липазы, установленная в настоящей работе (Ви-халемм, Линд, 1967;

Вихалемм, Тяхепыльд, 1968) и подтвержденная недавно другими исследователями (Arnesjö, Grubb, 1969; Rothman, 1970; Ramachandran et al., 1970) значительно выше, чем в структурных компонентах клетки. В свете этих фактов, не исключена возможность, что наряду с путем внутрицистернального транспорта секреторных ферментов, предложенным Сикевичем и Паладом (1958), существует и альтернативный путь с участием растворимой фракции.

Наши результаты по исследованию дальнейшего разделения растворимой фракции поджелудочной железы собак с последующим определением активности секреторных ферментов в полученных фракциях показали, что надежным методом разделения является гельфильтрация через сефадекс G-100, имеющая ряд преимуществ перед хроматографией на ДЭАЭ- и СМ-целлюлозах, как в отношении четкости разделения белковых фракций, так и сохранения их ферментативной активности, особенно при разделении наиболее лабильной липазы.

П. О распределении и свойствах АТФазы в поджелудочной железе

И. Распределение АТФазной активности в субклеточных фракциях поджелудочной железы и влияние на нее одно- и двухвалентных катионов

Как показали наши исследования (табл. 4), АТФазной активностью обладают все изученные субклеточные фракции поджелудочной железы как кошек (табл. 4 А), так и собак (табл. 4 Б), однако наиболее высокая удельная активность АТФазы была найдена во фракциях микросом и секреторных гранул и митохондрий. При этом у отдельных подопытных животных отмечались заметные колебания как в удельной активности, так и в распределении АТФазы по отдельным субклеточным фракциям поджелудочной железы.

Добавление одно- и двухвалентных катионов к субклеточным фракциям в инкубационной смеси выявило (табл. 4), что наиболее выраженное активирующее влияние на АТФазу

Таблица 4

Сравнительное распределение АТФазной активности (мкмоль $P_{неорг}$ /мг белка·мин) в субклеточных фракциях поджелудочной железы кошек (А) и собак (Б) в связи с присутствием одно- и двухвалентных катионов (в скобках приведено количество опытов)

Субклеточная фракция	Добавленные ионы			
	Mg^{2+}, Na^+, K^+	Mg^{2+}	Na^+, K^+	Ca^{2+}
А. Кошки				
Микросомальная	$0,196 \pm 0,079$ (6)	$0,134 \pm 0,057$ (6)	$0,062 \pm 0,022$ (6)	$0,267 \pm 0,055$ (6)
Секреторные гранулы и митохондрии	$0,183 \pm 0,068$ (6)	$0,183 \pm 0,068$ (6)	0 (6)	$0,167 \pm 0,047$ (6)
Растворимая	$0,169 \pm 0,030$ (6)	$0,169 \pm 0,030$ (6)	0 (6)	$0,132 \pm 0,052$ (6)
Б. Собаки				
Микросомальная	$0,264 \pm 0,038$ (4)	$0,243 \pm 0,027$ (9)	$0,021 \pm 0,011$ (4)	$0,276 \pm 0,054$ (9)
Секреторные гранулы и митохондрии	$0,174 \pm 0,022$ (9)	$0,174 \pm 0,022$ (9)	0 (9)	$0,258 \pm 0,066$ (9)
Растворимая	$0,147 \pm 0,025$ (9)	$0,147 \pm 0,025$ (9)	0 (9)	$0,133 \pm 0,030$ (9)

оказывают двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , особенно ионы Са. Самой высокой удельной активностью при наличии Ca^{2+} обладала микросомальная фракция как кошек ($0,267 \pm 0,055$), так и собак ($0,276 \pm 0,054$), хотя сравнительно высокой оказалась активность Ca^{2+} -АТФазы также во фракции секреторных гранул и митохондрий (соответственно $0,167 \pm 0,047$ и $0,258 \pm 0,066$) и

несколько ниже - в растворимой фракции (соответственно $0,132 \pm 0,052$ и $0,133 \pm 0,030$).

Наиболее высокая АТФазная активность при наличии ионов Mg^{2+} была найдена у собак также в микросомальной фракции ($0,243 \pm 0,027$). Заметно ниже и почти одинаковой оказалась активность Mg^{2+} -АТФазы у собак во фракции секреторных гранул и митохондрий ($0,174 \pm 0,022$) и в растворимой фракции ($0,147 \pm 0,025$). Несколько иное было распределение активности Mg^{2+} -АТФазы в субклеточных фракциях поджелудочной железы кошек: самой высокой АТФазной активностью обладала митохондриальная фракция ($0,183 \pm 0,068$), а в растворимой и микросомальной фракциях она составляла соответственно $0,169 \pm 0,030$ и $0,134 \pm 0,057$. Добавление ионов Na и K при наличии ионов Mg приводило лишь к незначительному увеличению активности Mg^{2+} -АТФазы, что проявлялось только в микросомальной фракции (табл. 4). Отсюда следует, что активность Na^+, K^+ -АТФазы в поджелудочной железе сравнительно низкая и обнаруживается как у кошек, так и у собак только в микросомальной фракции (составляя соответственно $0,062 \pm 0,022$ и $0,021 \pm 0,011$).

2. Влияние pH и различных концентраций ионов Ca , АТФ и АДФ на микросомальную АТФазу поджелудочной железы

Учитывая, что наиболее высокой и стабильной активностью АТФазы из изученных субклеточных фракций поджелудочной железы обладала микросомальная фракция, особенно при наличии ионов Ca (Ca^{2+} -АТФаза), нами проведена подробная характеристика некоторых свойств этой АТФазы.

а) Зависимость активности панкреатической Ca^{2+} -АТФазы от pH

Активность микросомальной Ca -АТФазы из поджелудочной железы собак (рис. 4 - I) и кошек (рис. 4 - II) продемонстрировала одинаковую зависимость от pH, имея больший оптимум активности в щелочной среде в диапа-

зоне рН 8,5 – 9,5 и малый – при рН 5,5 – 6,5. После гель-фильтрации через сефадекс G-100 удельная активность Ca^{2+} -АТФазы поджелудочной железы кошки увеличивалась в 2 – 3 раза, и рН оптимум в щелочной среде стал более четким, как это видно из рис. 4 – Ш.

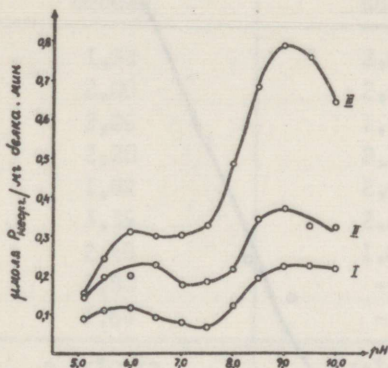


Рис. 4. Влияние рН на активность Ca^{2+} -АТФазы из микросомальной фракции поджелудочной железы собаки (I) и кошки (II) и на активность Ca^{2+} -АТФазы в препарате из микросомальной фракции поджелудочной железы кошки, обогащенном при помощи гель-фильтрации (III)

б) Зависимость активности панкреатической АТФазы от различных концентраций ионов Са

Как видно из рис. 5, при наличии различных концентраций ионов Са максимальная активность микросомальной АТФазы поджелудочной железы достигалась при концентрации этих ионов в пределах 0,7 – 3 мМ. Однако кривая зависимости активности АТФазы от концентрации ионов Са имеет S-образную форму, что свидетельствует об отклонении от классической кинетики Михаэлиса-Ментена и о возможном наличии кооперативных взаимодействиях ионов Са с молекулой АТФазы.

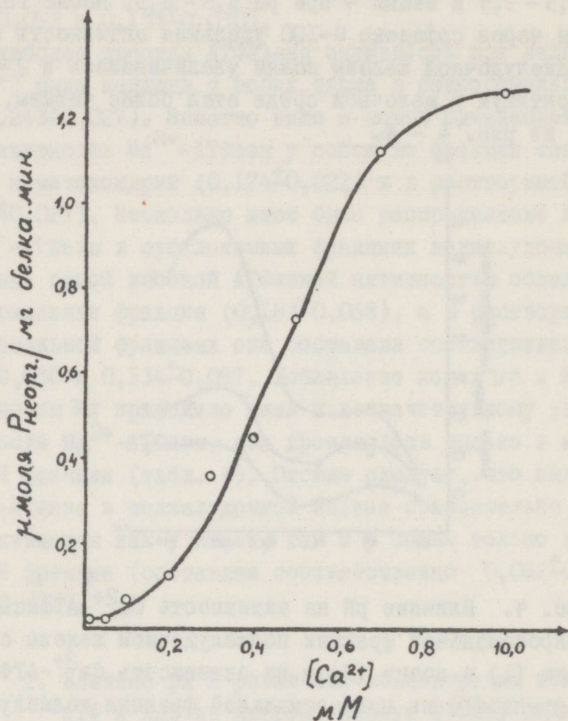


Рис. 5. Зависимость активности АТФазы поджелудочной железы собаки от концентрации ионов кальция

Кинетический анализ влияния различных концентраций ионов Са на панкреатическую АТФазу, проведенный при помощи графика Хилла, показал, что коэффициент Хилла для микросомальной АТФазы собак составляет 2,16 и для кошек - 2,14

Таблица 5

Кооперативное связывание ионов Са микросомальной панкреатической АТФазой

№ опыта	Коэффициент Хилла (n)	
	Собаки	Кошки
1	1,92	2,00
2	2,00	2,25
3	2,26	1,90
4	2,20	2,20
5	1,82	2,44
6	3,35	2,36
7	2,48	1,80
8	1,80	-
9	1,64	-
Среднее	2,16 \pm 0,17	2,14 \pm 0,09

(табл. 5); это известно как гомоторпный кооперативный эффект (Monod et al., 1963). Таким образом, приведенный факт подтверждает кооперативное связывание ионов Са с молекулой АТФазы и позволяет предположить наличие в молекуле этого фермента по крайней мере двух участков для связывания ионов кальция.

в) Зависимость активности микросомальной АТФазы от различных концентраций АТФ

Изучение кинетики гидролиза АТФ под действием панкреатической микросомальной Са²⁺-АТФазы при наличии различных концентраций субстрата (рис. 6) показало, что в этом случае коэффициент Хилла равняется 0,97. Следовательно, микросомальная Са²⁺-АТФаза не обладает способностью к гомотропному кооперативному связыванию молекул субстрата.

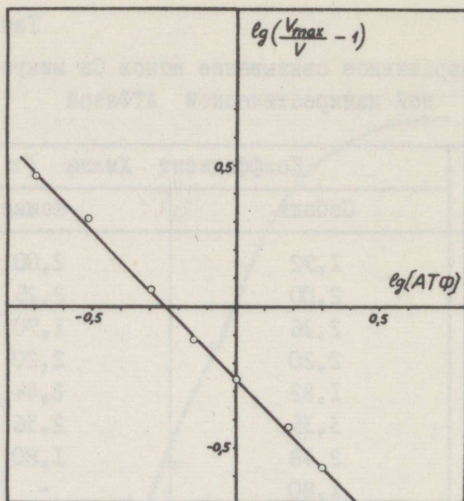


Рис. 6. Активность Ca^{2+} -АТФазы поджелудочной железы собаки при разных концентрациях АТФ, выраженная в виде графика Хилла; $n = 0,97$

г) Зависимость активности панкреатической АТФазы от различных концентраций АДФ

Нами проводилось исследование влияния различных концентрации ионов Са и АТФ на активность АТФазы при одновременном наличии различных концентраций АДФ (0,70, 1,25 и 2,00 мМ). Оказалось (рис. 7, табл. 6), что с увеличением концентрации АДФ увеличивается также коэффициент Хилла в отношении как ионов Са, так и АТФ. Такое воздействие второго эффектора (АДФ) на кооперативность первого эффектора (Ca^{2+}) известно в литературе под названием гетеротропного кооперативного эффекта (Monod et al., 1965; Robinson, 1967).

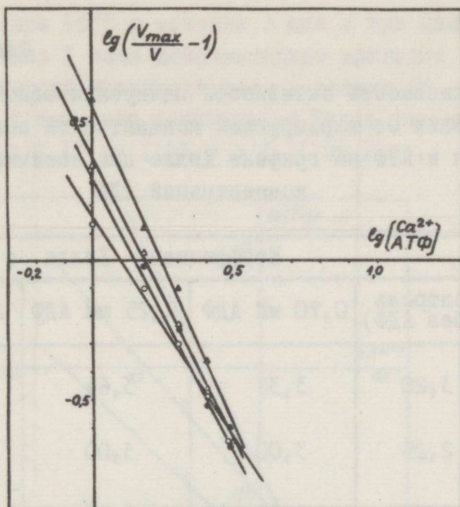


Рис. 7. Активность Ca^{2+} -АТФазы поджелудочной железы при разных концентрациях ионов кальция и АТФ, выраженная в виде графика Хилла в присутствии 3 разных концентрации АДФ

—○—○—	без АДФ	$n = 1,64$
—●—●—	0,70 мМ АДФ	$n = 1,80$
—△—△—	1,25 мМ АДФ	$n = 2,00$
—▲—▲—	2,00 мМ АДФ	$n = 2,34$

3. Влияние температуры и мочевины (десенсibilизирования) на микросомальную АТФазу поджелудочной железы

Из данных литературы (Нейфах, 1965; Charlain, 1966^a; Поляновский, 1968) известно, что кооперативные взаимодействия различных эффеkторов с молекулой фермента реализуются только тогда, когда субъединицы ферментной молекулы нахо-

Таблица 6

Зависимость активности панкреатической Ca^{2+} -АТФазы от варьирующих концентраций ионов кальция и АТФ на графике Хилла при наличии разных концентраций АДФ

№ опыта	Коэффициент Хилла (n)			
	Контроль (без АДФ)	0,70 мМ АДФ	1,25 мМ АДФ	2,00 мМ АДФ
1 кошка	3,20	3,32	3,64	4,12
2 кошка	2,25	3,00	3,00	3,00
3 собака	1,60	2,57	2,63	3,40
4 собака	1,64	1,80	2,00	2,34
5 собака	1,91	2,28	2,72	3,00
Среднее	2,12	2,59 $p < 0,01$	2,79 $p = 0,01$	3,17 $p < 0,001$

Примечание: p - достоверность различия между показателями контрольных опытов и опытов с воздействиями.

дятся в ассоциированной форме. Диссоциация ферментной молекулы на отдельные субединицы, вызванная под действием повышенной температуры (50°C), мочевины и др. факторов, приводит к исчезновению кооперативного связывания эффекторов с молекулой фермента, что принято называть десенсибилизированием (Gerhart, Pardee, 1962; Chaplain, 1966^a; Поляновский, 1968).

Наши опыты с десенсибилизированием панкреатической АТФазы показали (рис.8, табл.7), что преинкубирование фермент-

ного препарата при 50°C в течение 3 мин и при наличии 0,7 М мочевины в течение 1 часа действительно приводит к исчезновению кооперативного взаимодействия с ионами Ca. Это нашло свое выражение в том, что коэффициент Хилла уменьшался соответственно с 2,11 до 1,41 и с 2,11 до 1,34.

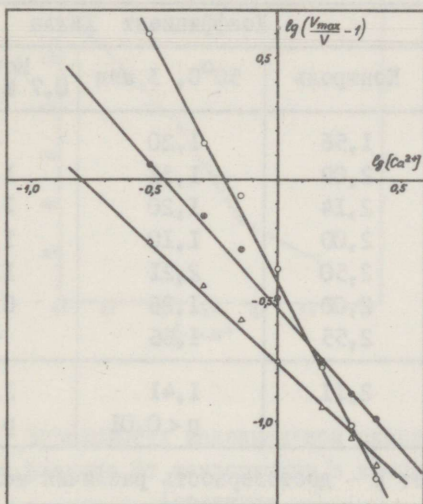


Рис. 8. Активность АТФазы поджелудочной железы кошки при разных концентрациях ионов кальция, выраженная в виде графика Хилла

- ферментный препарат без обработки $n = 2,00$
- △—△— после обработки ферментного препарата с раствором 0,7 М мочевины в течение 1 часа $n = 0,93$
- после 3 минутного термического воздействия при 50°C $n = 1,26$

Таблица 7

Коэффициент Хилла препарата АТФазы поджелудочной железы после термического воздействия и обработки раствором 0,7 М мочевины

№ опыта	Коэффициент Хилла		
	Контроль	50°C, 3 мин	Мочевина 0,7 М, 60 мин
1	1,56	1,20	-
2	2,00	1,32	1,25
3	2,14	1,20	1,56
4	2,00	1,10	1,45
5	2,50	2,21	1,52
6	2,00	1,26	0,93
7	2,55	1,66	-
Среднее	2,11	1,41 p < 0,01	1,34 p < 0,001

Примечание: p - достоверность различия между показателями контрольных опытов и опытов с воздействиями.

Примечательно, что исчезновение кооперативного связывания ионов Са с панкреатической Са²⁺-АТФазой в наших опытах не сопровождалось существенным уменьшением ее каталитической активности, что считается характерным для сенсibilизирования (Charlaine, 1966^a; Поляновский, 1968).

Нами изучалось также кинетика гидролиза АТФ под действием микросомальной Са²⁺-АТФазы при различных температурах (от 8° - 43°C), на основании чего был построен график Аррениуса (рис. 9) и вычислена энергия активации. Было найдено, что энергия активации в пределах температуры от 16° до 35°C, т.е. в области перелома кривой Аррениуса для панкреатической Са²⁺-АТФазы составляет 2,27 - 5,15 ккал/моль.

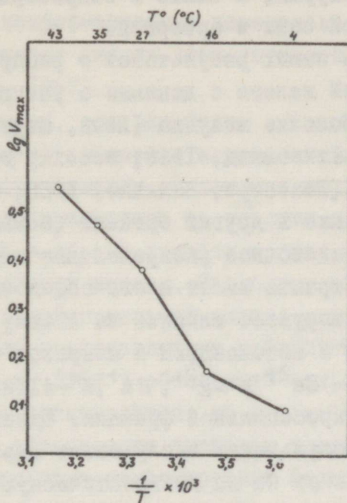


Рис. 9. Зависимость максимальной скорости Ca^{2+} -АТФазной реакции от температуры в координатах Аррениуса

4. Обсуждение результатов

Результаты данной части наших исследований показали прежде всего, что в поджелудочной железе кошек и собак имеется АТФаза, связанная преимущественно со структурными компонентами клетки - фракцией секреторных гранул и митохондрий и, в особенности, микросом.

В литературе мы не обнаружили данных об изучении активности АТФазы в субклеточных фракциях поджелудочной железы. АТФазная активность установлена в гомогенатах в миозиноподобном белке, выделенном из поджелудочной железы (Поглазов, 1962). По гистохимическим данным (Wachstein, Meisel, 1959; Barden, Lazarus, 1963; Täljedal et al., 1964), панкреатическая АТФаза локализована преимущественно

в мембранных структурах, а также в секреторных протоках и стенках капиллярной сети и артериол.

Сопоставление наших результатов о распределении АТФазы в поджелудочной железе с данными о распределении АТФазы в слизистой оболочке желудка (Линд, Мартинсон, 1964; Линд, 1967; Линд, Тяхепылд, 1968; Mozsik, Øye, 1969) и тонкого кишечника (Лааспере, Виллако, 1968; Quigely, Gotterer, 1969), а также в других органах (Hosie, 1965) показывает, что внутриклеточное распределение этого фермента в пищеварительном тракте имеет много общих черт.

Заметное активирующее влияние на АТФазу во фракциях секреторных гранул и митохондрий и микросом оказывают двухвалентные катионы - Ca^{2+} и Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФаза была обнаружена только в микросомальной фракции. Однако, особого внимания в наших результатах заслуживает выраженное активирующее влияние ионов Са на панкреатическую АТФазу, особенно в микросомальной фракции, значительно превышающее таковое в субклеточных фракциях слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника (Линд, 1967; Виллако и др., 1969). Возможно, что такая зависимость панкреатической АТФазы от наличия ионов Са находится во взаимосвязи с особой ролью этого иона в секреторной деятельности поджелудочной железы (Олейник, 1967; Zimmermann et al., 1967; Rubin, 1970).

Найденный нами рН-оптимум панкреатической микросомальной Ca^{2+} -АТФазы в щелочной среде (рН 8,5 - 9,5) совпадает с рН оптимумом панкреатического миозиноподобного белка, выделенного Поглазовым (1962), но отличается от рН оптимумов АТФаз из слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника при наличии ионов Са (Виллако и др., 1969).

Изучение кинетики гидролиза АТФ микросомальной АТФазы в зависимости от наличия различных концентраций ионов Са, АТФ и АДФ выявило как гомотропный, так и гетеротропный кооперативный характер связывания этих эффекторов с молекулой фермента, который ослабевал после десенсибилизации ферментного препарата под действием температуры и мочевины. Наличие перелома на графике Аррениуса в области 16 -

- 35°С свидетельствует о большой скорости гидролиза АТФ и о возможности конформационных переходов в молекуле фермента при относительно низких физиологических температурах (Wood, Beutler, 1967).

Таким образом, все эти факты в целом говорят в пользу того, что панкреатическая микросомальная Ca^{2+} -АТФаза относится к аллостерическим системам с вытекающими отсюда определенными возможностями ее участия в качестве регуляторного фактора в обмене веществ и энергетике секреторных клеток поджелудочной железы. Поскольку активность Na^+ , K^+ -АТФазы в этой пищеварительной железе сравнительно низкая и поэтому может по представлениям последнего времени (Ridderstap, Bonting, 1969) обеспечить секрецию панкреатическим соком лишь электролитов, то вполне возможно, что в энергетическом обеспечении процесса биосинтеза и внутриклеточного транспорта секретируемых ферментов и их регуляции особая роль принадлежит именно ионами Са и микросомальной Ca^{2+} -АТФазе. Изложенные аспекты участия панкреатической Ca^{2+} -АТФазы в секреторной деятельности поджелудочной железы заслуживает, на наш взгляд, дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Изучение сравнительного распределения основных секреторных ферментов (протеаз, амилазы и липазы) в первичных субклеточных фракциях поджелудочной железы собак показало, что наиболее высокая удельная активность протеаз (ед/мг белка) наблюдается в суммарной фракции секреторных гранул и митохондрий и микросомальной фракции, в растворимой фракции она примерно в 2 раза ниже. В то же время общая протеазная активность (ед. на всю фракцию) оказалась наиболее высокой в растворимой фракции, уменьшаясь соответственно во фракциях секреторных гранул и митохондрий и во фракции микросом.
2. Удельная активность панкреатической амилазы распределена в основном между фракциями секреторных гранул-митохондрий и растворимой, являясь сравнительно низкой в микросомальной фракции. Однако, подавляющая часть общей активности амилазы находится в растворимой фракции, в структурных компонентах клетки ее сравнительно мало.
3. Удельная активность панкреатической липазы, будучи наиболее высокой во фракции секреторных гранул и митохондрий, равномерно уменьшается соответственно в микросомальной и растворимой фракциях. В то же время общая липазная активность была наиболее высокой в растворимой фракции, значительно ниже во фракциях секреторных гранул и митохондрий и, в особенности, микросом.
4. Результаты, полученные относительно сравнительного распределения секреторных ферментов в субклеточных фракциях поджелудочной железы, в известной степени зависят от способа выражения ферментативной активности. Поскольку количественный и качественный белковые составы отдельных субклеточных фракций существенно различаются, удельная активность секреторных ферментов не отражает действительного их содержания в субклеточных фракциях,

и поэтому в таких исследованиях следует считать наиболее оправданным сопоставление общей активности секреторных ферментов.

5. Постоянное наличие всех основных секреторных ферментов в растворимой фракции, превышающей по их общей активности структурные компоненты клетки, заставляет предполагать наличие в поджелудочной железе, помимо предложенного Сикевичем и Паладом внутрицистернального транспорта секреторируемых ферментов, также другого пути с участием растворимой фракции (цитоплазмы).
6. Для дальнейшего разделения растворимой фракции поджелудочной железы собаки с целью выделения и очистки отдельных секреторных ферментов подходящим методом, кроме хроматографии на целлюлозионитах, является гель-фильтрация через сефадекс G-100, обеспечивающая четкое разделение белковых фракций и хорошее сохранение ферментативной активности полученных белковых фракций, в частности липазной.
7. В поджелудочной железе кошек и собак встречается АТФаза с наиболее высокой активностью во фракциях микросом и секреторных гранул и митохондрий. Выраженное активирующее влияние на панкреатическую АТФазу оказывают двухвалентные катионы, особенно Ca^{2+} , с оптимальной концентрацией 0,7 - 3 мМ, несколько меньше Mg^{2+} . Активность Na^+ , K^+ -АТФазы ниже, и найдена она только в микросомальной фракции.
8. рН-оптимум препарата панкреатической микросомальной АТФазы, выделенной из первичной фракции микросом путем ее обработки дезоксихолатом натрия и осаждения нерастворимых мембранных частиц, находился в пределах 8,5 - 9,5, значительно менее выраженный - при 5,5 - 6,5.
9. Кинетический анализ гидролиза АТФ препаратами микросомальной АТФазы поджелудочной железы при наличии различных концентраций ионов Са выявил отклонение от классической кинетики Михаэлиса-Ментена. Коэффициент

Хилла, найденный при помощи графика Хилла, равнялся для микросомальной АТФазы кошек и собак в отношении ионов Са соответственно 2,16 и 2,14, что свидетельствует о наличии кооперативного связывания ионов Са с молекулой фермента (гомотропный кооперативный эффект).

10. Различные концентрации субстрата (АТФ) не обнаружили кооперативного характера его связывания с панкреатической микросомальной АТФазой. При наличии же ингибитора (АДФ) в различных концентрациях (0,7; 1,25 и 2,0 мМ) установлено кооперативное связывание как ионов Са, так и АТФ (гетеротропный кооперативный эффект).
11. Преинкубирование препаратов панкреатической микросомальной АТФазы при 55°C в течение 3 мин или при наличии мочевины в концентрации 0,7 М в течение 60 мин (десенсибилизирование) ведет к снижению коэффициента Хилла в отношении ионов Са соответственно с 2,11 до 1,41 и 1,34, что говорит об ослаблении кооперативного взаимодействия ионов Са с молекулой фермента.
12. Результаты кинетического анализа гидролиза АТФ под действием панкреатической микросомальной Са²⁺-АТФазы позволяют отнести этот фермент к аллостерическим системам, участвующим, видимо, не только в обмене и транспорте ионов Са, но и в специфических внутриклеточных процессах, связанных с секреторной деятельностью поджелудочной железы.

Основное содержание диссертации опубликовано
в следующих статьях:

1. Т. Вихалемм, А. Линд, Т. Илометс, 1964. Разделение растворимой фракции гомогената поджелудочной железы на целлюлозоионитах.
Ученые записки ТГУ, IX (163) 241-246
2. Т.Э. Вихалемм, А.Я. Линд, 1965. Разделение растворимой фракции гомогената поджелудочной железы гель-фильтрацией на сефадексе.
Ученые записки ТГУ, XI (178) 255-260
3. Т.Э. Вихалемм, А.Я. Линд, 1967. О распределении ферментов в субклеточных фракциях поджелудочной железы.
Ученые записки ТГУ, XVI (210) 173-179
4. Т.Э. Вихалемм, А.П. Калликорм, А.О. Кенгсепп, Х.П. Линд, Л.Я. Тяхепыльд, 1967. О распределении и свойствах некоторых каталитических активных белков в пищеварительных железах желудка и поджелудочной железы. Тезисы докладов.
IX Всесоюзная конференция по физиологии пищеварения, Одесса, 49-50
5. Т.Э. Вихалемм, Л.Я. Тяхепыльд, 1968. О распределении пищеварительных ферментов и АТФазы в субклеточных фракциях поджелудочной железы.
Ученые записки ТГУ, XVШ (215) 315-321
6. Т.Э. Вихалемм, У.С. Тарве, 1968. Об особенностях распределения и свойствах аденозинтрифосфатазы в поджелудочной железе.
Материалы III биохимической конференции Белорусской, Латвийской, Литовской и Эстонской Советских Социалистических Республик, Минск, 322-324

7. Т.Э. Вихалемм, 1969. Особенности аденозинтрифосфатной (АТФазной) реакции в поджелудочной железе.

Материалы Эстонского республиканского совещания по вопросам получения и применения ферментов, Таллин, 23-24

8. Вихалемм Т.Э., 1969. О свойствах панкреатической АТФазы. Тезисы докладов.

II Всесоюзный биохимический съезд, Ташкент, вып. 3, 38

Т.Э. Вихалемм

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА
ОСНОВНЫХ СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ
И АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ (АТФ азм)
В СУБЦЕЛЮТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тартуский государственный университет
ЭССР, г. Тарту, ул.Кликооли, 18

Ротапринт ТГУ 1971. Подписано к печати 12/У 1971 г.
Печ. листов 2,5. Тираж 200 экз. Бумага 30x45.1/4
МВ 06183. Зак. № 417

Бесплатно

Бесплатно

TÜ RAAMATUKOGU



1 0300 00423911 9