

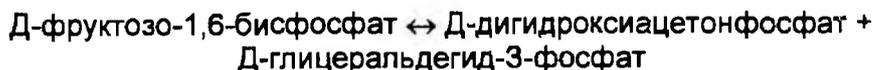


УДК 577.154

В.И. Гидранович

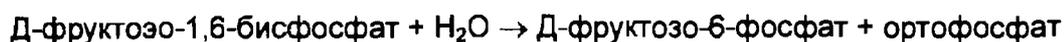
Кинетическая характеристика фруктозобисфосфат-альдолазы и фруктозо-бисфосфатазы в эндокринных железах

Фермент фруктозобисфосфат-альдолаза (Д-фруктозо-1,6-бисфосфат-Д-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза, КФ 4.1.2.13) широко распространен в природе, выделен из различных органов и тканей и впервые был открыт в 1934 году [1]. Фруктозобисфосфатальдолаза катализирует обратимую реакцию по уравнению:



Фруктозо-1,6-бисфосфат является, с одной стороны, продуктом фосфофруктокиназной реакции, а, с другой стороны в организме животных он образуется в процессе глюконеогенеза из триозофосфатов. Равновесие фруктозо-бисфосфат-альдолазной реакции сильно сдвинуто в сторону образования фруктозо-1,6-бисфосфата [2,3,4].

Фруктозо-бисфосфатаза (Д-фруктозо-1,6-бисфосфат-1-фосфогидролаза, 3.1.3.11) катализирует реакцию дефосфорилирования фруктозо-1,6-бисфосфата:



Оба эти фермента конкурируют за один субстрат и в зависимости от направленности метаболизма – гликолиза или глюконеогенеза-фруктозо-1,6-бисфосфат может подвергаться действию фруктозобисфосфат-альдолазы или фруктозо-бисфосфатазы. Изучение сравнительной кинетической характеристики этих ферментов важно для оценки направленности и интенсивности, а также выяснения механизмов метаболизма углеводов, обеспечивающих функциональную активность эндокринных желез.

Предметом исследования было изучение кинетики фруктозобисфосфат-альдолазной и фруктозо-бисфосфатазной реакции в коре и мозговом веществе надпочечников, в поджелудочной и щитовидной железах жвачных животных, у которых специфика пищеварения обуславливает особенности метаболизма.

Фруктозобисфосфат-альдолазную реакцию оценивали по образованию триозофосфатов [5], а фруктозо-бисфосфатазную – по интенсивности отщепления ортофосфата, который определяли по Островскому [6]. Кроме того, в реакционной среде контролировали использование фруктозо-1,6-бисфосфата, концентрацию которого определяли ферментативным методом с

использованием кристаллической фруктозобисфосфат-альдолазы [5].

С целью сравнительной кинетической характеристики изучаемых ферментов различных эндокринных желез рассчитывали:

- начальную скорость реакций (V)
- максимальную (предельную) скорость (V_{\max})
- константу Михаэлиса (K_m)

Константу Михаэлиса и максимальную скорость по данным ряда измерений скорости реакции при различных концентрациях субстрата определяли, используя два графических метода [7, 8]. Вначале строили график зависимости скорости реакции (V) от концентрации субстрата $[S]$ согласно уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

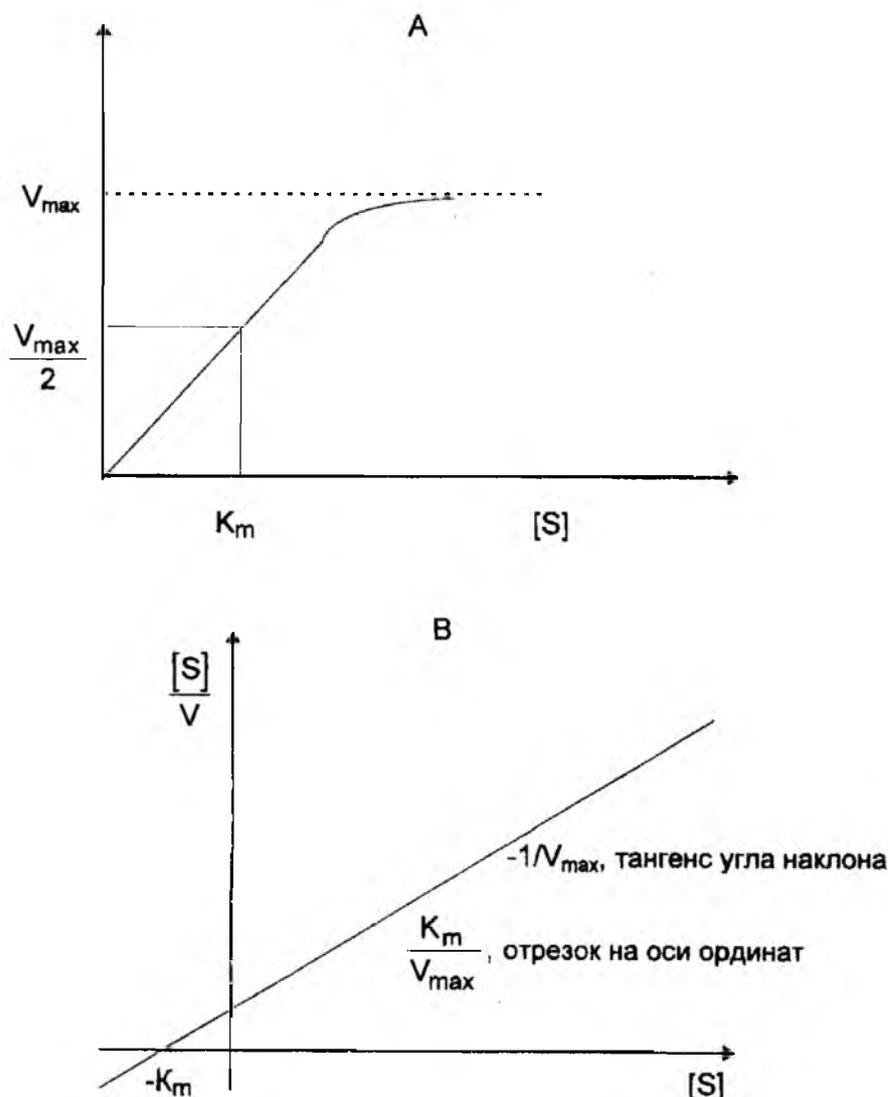


Рис. 1. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (А – гиперболическая, В – прямолинейная)

Полученная кривая представляет собой отрезок равнобочной гиперболы (рис. 1А). При замене V на $V_{\max}/2$ получаем $[S] = K_m$ и величина которой равна абсциссе "средней" точки экспериментальной кривой [8]. По полученной гипер-

болической кривой можно лишь с определенной точностью определить K_m , а определение V_{max} в ряде случаев затруднено, т.к. в эксперименте не всегда удается достичь полного насыщения фермента субстратом. Используемый второй метод состоит в построении графика зависимости $[S]/V$ от $[S]$ в соответствии с уравнением:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}}$$

полученным в результате умножения обеих частей уравнения Лайнуивера-Бэрка, соответствующее методу двойных обратных величин на $[S]$:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

В данном случае тангенс угла наклона равен $1/V_{max}$, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен K_m (рис. 1B).

Использование различных методов и сопоставление расчетных данных позволяет получить более объективные и достоверные данные по кинетической характеристике изучаемых ферментов.

Инкубирование гомогенатов эндокринных желез при 100-кратном разведении (рН 7,4) с фруктозо-1,6-бисфосфатом сопровождается уменьшением его концентрации в реакционной среде. Так, например, при 4-ммольярной концентрации в инкубационной среде поджелудочной железы убыль фруктозо-1,6-бисфосфата за 4,8,16,32 и 64 минуты соответственно составила 11,87; 15,20; 29,39; 45,20; и 63,73%. Аналогичное явление наблюдается во всех изучаемых железах. При низких концентрациях степень использования субстрата относительно высокая, а с повышением концентрации наблюдается обратная зависимость (таблица 1).

Таблица 1

Использование фруктозо-1,6-бисфосфата в зависимости от его концентрации гомогенатами эндокринных желез (64 минуты инкубации)

Концентрация субстрата ммоль/л	Железы							
	Кора надпочечников		Мозговое вещество надпочечников		Поджелудочная железа		Щитовидная железа	
	%	P	%	P	%	P	%	P
1	73,65	<0,05	70,75	<0,001	84,05	<0,01	86,17	<0,05
2	61,15	<0,05	62,10	<0,01	60,04	<0,01	65,28	<0,01
4	36,43	<0,02	58,88	<0,02	63,73	<0,01	44,65	<0,01
8	26,33	<0,01	26,52	<0,01	37,86	<0,01	29,10	<0,01
12	19,24	<0,001	27,54	<0,001	33,24	<0,001	28,74	<0,001
16	16,74	<0,001	18,50	<0,001	32,96	<0,001	18,48	<0,001

Следовательно, степень использования фруктозо-1,6-бисфосфата гомогенатами эндокринных желез определяется его концентрацией и временем реакции, и приведенные данные свидетельствуют о включении фруктозо-1,6-бисфосфата в метаболические процессы, и, в первую очередь, в результате действия фруктозобисфосфат-альдозазы.

Анализ динамики фруктозобисфосфат-альдозазной реакции в гомогенатах эндокринных желез показывает, что процесс образования триозофосфатов в коре надпочечников и поджелудочной железе протекает линейно до

8 минут, а в мозговом слое надпочечников и щитовидной железе до 16 минут. В ряде случаев, при низких концентрациях фруктозо-1,6-бисфосфата, устанавливается динамическое равновесие реакции. В большинстве наблюдений образование триозофосфатов в реакционной среде происходит в течение всего времени инкубации (64 минуты).

Более интенсивно образование триозофосфатов протекает в гомогенатах поджелудочной железы. Так, за 16 минут при 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 16 ммольной концентрациях субстрата образуется соответственно триозофосфатов (мкмоль/мг белка):

- в поджелудочной железе $-1,37 \pm 0,01$; $2,77 \pm 0,25$; $3,47 \pm 0,31$; $4,03 \pm 0,31$; $4,50 \pm 0,19$; $4,60 \pm 0,09$; $4,97 \pm 0,33$;
- в мозговом веществе надпочечников $- 1,35 \pm 0,02$; $2,75 \pm 0,12$; $3,30 \pm 0,21$; $3,59 \pm 0,27$; $3,68 \pm 0,27$; $4,22 \pm 0,39$; $4,37 \pm 0,32$;
- в коре надпочечников $- 0,76 \pm 0,06$; $1,59 \pm 0,23$; $2,26 \pm 0,23$; $2,47 \pm 0,30$; $2,96 \pm 0,35$; $3,03 \pm 0,34$; $2,72 \pm 0,30$;
- в щитовидной железе $- 0,50 \pm 0,04$; $1,03 \pm 0,13$; $1,17 \pm 0,16$; $1,23 \pm 0,18$; $1,27 \pm 0,19$; $1,39 \pm 0,22$.

Начальная скорость фруктозобисфосфат-альдолазной реакции эндокринных желез при различных концентрациях субстрата представлена в таблице 2.

Таблица 2

Зависимость начальной скорости фруктозобисфосфат-альдолазной реакции от концентрации субстрата ($\text{мкмоль} \times 10^{-2} \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ белка)

Концентрация субстрата м моль/л	Железы			
	Кора надпочечников	Мозговое вещество надпочечников	Поджелудочная железа	Щитовидная железа
0,5	$12,21 \pm 0,61$	$22,51 \pm 0,73$	$20,63 \pm 0,68$	$2,56 \pm 0,12$
1	$22,38 \pm 1,50$	$40,69 \pm 1,66$	$41,21 \pm 1,72$	$4,05 \pm 0,29$
2	$24,85 \pm 1,98$	$44,17 \pm 3,54$	$53,25 \pm 3,80$	$8,50 \pm 0,63$
4	$24,30 \pm 2,06$	$44,07 \pm 2,91$	$62,45 \pm 4,65$	$9,57 \pm 0,93$
8	$25,05 \pm 1,77$	$42,88 \pm 3,11$	$68,44 \pm 4,57$	$10,52 \pm 0,97$
12	$25,44 \pm 2,06$	$45,38 \pm 3,04$	$71,70 \pm 5,12$	$13,34 \pm 1,03$
16	$26,27 \pm 0,84$	$40,46 \pm 1,04$	$70,11 \pm 6,00$	$15,18 \pm 1,38$

Из приведенных данных видно, что в коре и мозговом веществе надпочечников фруктозобисфосфат-альдолазная реакция с 2 ммольной концентрацией субстрата протекает по нулевому порядку. В поджелудочной железе нулевой порядок реакции наблюдается с 4-8 ммольной концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, а в щитовидной железе при изучаемых концентрациях не наблюдается полного насыщения фермента субстратом.

Результаты расчетов кинетических параметров фруктозобисфосфат-альдолазы в изучаемых железах представлены в таблице 3.

Одновременно с расщеплением фруктозо-1,6-бисфосфата в фруктозобисфосфат-альдолазной реакции на триозофосфаты, определенная часть этого субстрата в изучаемых эндокринных железах подвергается дефосфорилированию при участии фермента фруктозо-бисфосфатазы с образованием фруктозо-6-фосфата и ортофосфата. Процесс дефосфорилирования протекает сравнительно медленно и линейная зависимость нарастания ортофосфата поддерживается до 16-32 минут инкубации. Относительно высокий процент дефосфорилирования фруктозо-1,6-бисфосфата поддерживается в коре надпочечников и поджелудочной железе (таблица 4).

Таблица 3

**Кинетическая характеристика фруктозобисфосфат-альдозазы
эндокринных желез**

Железы	Показатели	
	K_m , моль $\times 10^{-3} \times \text{л}^{-1}$	V_{\max} , мкмоль $\times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ белка
Кора надпочечников	0,48	26,66
Мозговое вещество надпочечников	0,56	46,66
Поджелудочная железа	0,68	75,89
Щитовидная железа	3,60	18,00

Таблица 4

**Дефосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфата в зависимости
от его концентрации (64 минуты инкубации)**

Концентрация субстрата ммоль/л	Железы							
	Кора надпочечников		Мозговое вещество надпочечников		Поджелудочная железа		Щитовидная железа	
	%	P	%	P	%	P	%	P
1	31,34	<0,05	14,00	<0,01	25,27	<0,01	14,06	<0,01
2	27,44	<0,001	10,94	<0,001	17,51	<0,001	8,89	<0,01
4	17,39	<0,05	6,40	<0,02	11,24	<0,05	4,89	<0,05
8	12,18	<0,01	6,10	<0,001	7,04	<0,001	3,62	<0,01
12	10,30	<0,001	4,49	<0,02	5,30	<0,001	3,00	<0,01
16	9,55	<0,01	2,00	<0,01	4,62	<0,001	3,08	<0,01

С повышением концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата с 1 до 16 ммольной процент дефосфорилирования уменьшается в коре надпочечников в 3,28 раза, в щитовидной железе в 4,56, в поджелудочной железе в 5,46 и мозговом веществе надпочечников в 7 раз, что может быть связано с явлением субстратного ингибирования.

Кинетические параметры фруктозо-бисфосфатазы представлены в таблице 5.

Таблица 5

**Кинетическая характеристика фруктозо-бисфосфатазы
эндокринных желез**

Железы	Показатели	
	K_m , моль $\times 10^{-3} \times \text{л}^{-1}$	V_{\max} , мкмоль $\times \text{мин}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ белка
Кора надпочечников	3,30	0,97
Мозговое вещество надпочечников	4,00	0,77
Поджелудочная железа	3,40	0,75
Щитовидная железа	3,40	1,85

Исходя из представлений, что K_m представляет константу равновесия реакции диссоциации:



и является величиной, обратной сродству фермента к субстрату, а V_{max} представляет собой меру константы скорости распада фермент-субстратного комплекса, то анализ полученных кинетических параметров показывает, что фруктозобис-альдолаза и фруктозо-бисфосфатаза различных эндокринных желез характеризуются своими особенностями.

Оценивая сродство фермента к субстрату по величине $1/K_m$ видно, что фруктозобисфосфат-альдолаза коры и мозгового вещества надпочечников имеет высокое сродство к фруктозо-1,6-бисфосфату. Сродство к субстрату фруктозобисфосфат-альдолазы поджелудочной железы в 2 раза, а щитовидной железы в 7 раз ниже по сравнению с фруктозобисфосфат-альдолазой коры надпочечников.

Фруктозобисфосфат-альдолаза поджелудочной железы при сравнительно невысоком сродстве к субстрату характеризуется самой высокой величиной константы скорости распада фермент-субстратного комплекса. В мозговом веществе и коре надпочечников с повышением сродства фруктозобисфосфат-альдолазы к субстрату происходит снижение константы скорости распада фермент-субстратного комплекса. Фруктозобисфосфат-альдолаза щитовидной железы при низком сродстве к субстрату характеризуется и самой низкой константой скорости распада фермент-субстратного комплекса.

Фруктозо-бисфосфатаза изучаемых эндокринных желез, за небольшим отличием этого фермента мозгового вещества надпочечников, характеризуется одинаковым сродством к субстрату. При этом фруктозо-бисфосфатаза щитовидной железы имеет примерно в 2 раза более высокую константу скорости распада фермент-субстратного комплекса по сравнению с ферментом в других железах.

Сравнивая кинетическую характеристику фруктозо-бисфосфатазы и фруктозобисфосфат-альдолазы соответствующих эндокринных желез следует отметить, во-первых, что фруктозо-бисфосфатаза поджелудочной железы, коры и мозгового вещества надпочечников имеет низкое сродство к субстрату по сравнению с фруктозобисфосфат-альдолазой этих же желез. Оба фермента щитовидной железы имеют одинаковое сродство к субстрату. Во-вторых, мера константы скорости распада фермент-субстратного комплекса фруктозобисфосфатазы по сравнению с фруктозобисфосфат-альдолазой ниже в щитовидной железе почти в 10 раз, в коре надпочечников – в 27, в мозговом веществе надпочечников – в 60 и поджелудочной железе – в 100 раз.

Следовательно, конкурентная способность за фруктозо-1,6-бисфосфат у фруктозо-бисфосфатазы низкая по сравнению с фруктозобисфосфат-альдолазой. Высокое сродство к субстрату и преобладание активности фруктозобисфосфат-альдолазы над фруктозо-бисфосфатазой позволяет фруктозобисфосфат-альдолазе конкурировать за фруктозо-1,6-бисфосфат и ориентировать метаболизм в эндокринных железах преимущественно по гликолитическому пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Megerhof O., Lohman K.* Über die enzymatischen Gleichgewichtsreaction zwischen Hexosediphosphatesaure und Dioxyacetonphosphorsaute // *Biochem.Zschr.*, 1934. 271. P.89-110.
2. *Энгельгардт В.А., Саков Н.Е.* О механизме пастеровского эффекта // *Биохимия*, 1943. 8, а 1. С.9-36.

3. *Passonean J.V., Lawry O.K.* Phosphofruktokinase and Pasteur effect // Biochem. biophys. Res. Communis, 1962. -7, № 1. P. 10-15.
4. *Rose I., Reider S.V.* Studies on the mechanism the aldolase reaction. Isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase // J.Biol.Chem., 1959. -231, № 1. P. 315-329.
5. *Bruns F.* Bestimmung and Eigenschaften des Serumaldolase // Biochem. Z., 1954. -325, -112. P. 156-162.
6. *Островский Ю.М.* Микрометод определения неорганического фосфата в крови // Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969. С. 437.
7. *Полторак О.М., Чухрай Е.С.* Физико-химические основы ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1971. -311 с.
8. *Диксон М., Узбб Э.* Ферменты: в 3-х томах. М., 1982. Т.1. - 392 с.; Т.2. - 515 с.; Т.3. -1120 с.

S U M M A R Y

Kinetic characteristic of fructose bis phosphate aldolase and fructose bis phosphatase which compete for fructose-1,6-bis phosphate is expounded in this article. Low affinity fructose bis phosphatase of pancreas, cortex and medulla of adrenal glands compared with fructose bis phosphate aldolase for fructose 1,6 bis phosphate was studied.