

В.И. Гидранович, В.А. Лазарчик

Механизм ингибирования щелочной фосфатазы тонкого отдела кишечника синицы большой ионами меди

Щелочная фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (щелочной оптимум), КФ 3.1.3.1) катализирует реакцию по уравнению:



Фермент широко специфичен, катализирует также реакции трансфосфорилирования и носит прочие названия, такие, как щелочная фосфомоноэстераза, фосфомоноэстераза, глицерофосфатаза. Под термином «щелочная фосфатаза» следует понимать ряд ферментов, общей чертой которых является оптимум рН в пределах 7,6–10,3 [1].

Щелочная фосфатаза обнаружена в различных источниках животного, растительного и микробного происхождения. У животных фермент содержится в значительных количествах в почках, слизистой оболочке кишечника, предстательной железе, печени, поджелудочной и щитовидной железах, легких, селезенке, яичниках. Щелочная фосфатаза обнаруживается и в других органах, а также в биологических жидкостях. Наиболее высокая активность щелочной фосфатазы проявляется в печени, почках, слизистой оболочке кишечника, костной ткани. Следует отметить, что фермент, выделенный из различных тканей, проявляет неодинаковую специфичность к различным субстратам. Наиболее высокой активностью обладает щелочная фосфатаза при использовании β -глицерофосфата.

В печени щелочная фосфатаза, локализуясь в клеточной мембране, участвует в транспорте неорганического фосфата. Щелочная фосфатаза в плаценте дефосфорилирует фосфопротеины, отщепляя щелочнолабильный фосфат. Поскольку гликогенсинтаза и гистоны дефосфорилируются щелочной фосфатазой, то это дает основание считать, что фермент играет определенную роль в регуляции биосинтеза гликогена и экспрессии генома в клетках млекопитающих.

В костной ткани щелочная фосфатаза локализована в остеобластах, обнаружена в области эпифизарного хряща длинных костей, гиалиновом хряще и проявляет высокую активность в местах кальцификации. Фермент освобождает фосфат из фосфорных эфиров моносахаридов, образующихся из гликогена, и при наличии ионов кальция и магния происходит образование нерастворимых фосфатов кальция и магния. Высокая активность щелочной фосфатазы наблюдается в костях молодых растущих организмов. Повышение активности фермента при рахите связано с проявлением патологически высокой активности остеобластов.

Щелочная фосфатаза находится как в плазме, так и форменных элементах и выполняет определенную роль в фагоцитозе. Так, при фагоцитозе белого стафилококка бактерии заключаются в фагосому. Гранулы полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов, содержащие фосфатазы, сливаются с фагосомами. Ферменты проникают в фагосомы и обволакивают поверхность бактериальных клеток. При этом в одних фагосомах обнаруживается только кислая, а в других только щелочная фосфатаза. Механизм действия щелочной фосфатазы на бактерии заключается в гидролизе фосфопротеинов и нуклеиновых кислот, но не исключено, что фермент как бы подготавливает бактерии для последующего воздействия других бактерицидных факторов, содержащихся в нейтрофильных лейкоцитах. Роль щелочной фосфатазы в фагоцитозе подтверждается синдромом полного отсутствия фермента в нейтрофильных лейкоцитах, который проявлялся клинически хронической бактериальной инфекцией [2].

В извитых канальцах почек щелочная фосфатаза принимает участие в реабсорбции углеводов. Ферменты, выделенные из *E. coli* и из слизистой тонкого отдела кишечника, имеют много сходства между собой [3, 4]. Высокая активность щелочной фосфатазы в слизистой тонкого отдела кишечника, которая локализована в микросомах клеток поверхностного эпителия, по-видимому, связана с всасыванием углеводов.

Фермент щелочная фосфатаза содержит прочно связанные ионы цинка и является цинк-протеином с молекулярной массой 80000. Молекула белка-фермента в кислой среде диссоциирует на две идентичные субъединицы, а при высокой концентрации ионов цинка образуется тетрамер, причем равновесие между димерными и тетрамерными формами зависит от величины pH. В димерной форме щелочной фосфатазы содержится от двух до четырех атомов цинка, при этом только два атома цинка определяют каталитическую активность фермента. Активность молекулы щелочной фосфатазы, содержащей один атом цинка, составляет 12% активности комплекса с двумя или более атомами этого металла. Константы комплексообразования при pH 8,5 и 25° C в 1 M растворе NaCl для первого иона цинка $pK_1 = 7,66$, а для второго – $pK_2 = 10,22$. Третий и четвертый ионы цинка диссоциируют легче двух первых, определяющих активность фермента. Ионы цинка можно удалить обработкой щелочной фосфатазы хелатирующими агентами. Образовавшийся апофермент может присоединять разнообразные двухзарядные ионы: Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} . Прочность комплексов для центра с наименьшим сродством уменьшается в ряду $Cd^{2+} = Mn^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$. Положение в этом ряду Cu^{2+} и Hg^{2+} неизвестно, однако Cu^{2+} присоединяется прочнее Zn^{2+} . Каталитической активностью обладает только Co^{2+} -фосфатаза, которая составляет 12% активности цинксодержащего фермента и не обладает трансферной активностью. Далеко не полной является информация о присоединении металлов на ферменте, хотя ряд экспериментальных данных свидетельствует, что в этом процессе принимают участие остатки гистидина и тирозина, входящие в активный центр щелочной фосфатазы [1, 5, 6].

Специфическая роль ионов Cu^{2+} в организме определяется малым диаметром, высокой атомной массой, способностью легко изменять степень окисления и образовывать стойкие комплексные соединения с аминокислотными остатками белков и, в частности, ферментов. Медь одинаково хорошо связывается как с кислородсодержащими, так и азотсодержащими органическими соединениями, связь ее сильнее других катионов и поэтому способна вытеснять их из комплексов.

Медь, с одной стороны, является крайне необходимым микроэлементом, выполняя биотическую роль, входя в состав цитохромоксидазы, церулоплаз-

мина, супероксиддисмутазы, гемоцианина, тирозиназы, уриказы, моноаминоксидазы, диаминоксидазы и других белков и ферментов. Наряду с железом медь участвует в кроветворении. В условиях дефицита меди нарушается насыщение трансферина железом и его обмен между плазмой и эритроцитами, что является причиной их гемолиза. С другой стороны, растворимые соли меди в определенных концентрациях оказывают токсическое действие на организм животных. Чувствительность к избытку меди сильно варьирует как между большими таксономическими группами, так и в пределах одного вида [6–8].

В последнее время наблюдается прогрессирующее загрязнение биосферы тяжелыми металлами и, в частности, медью. В целом по Республике Беларусь избыточное накопление отдельных химических элементов наблюдается на 6–10% пахотных земель. На территориях крупных городов содержание меди выше допустимого по санитарно-гигиеническим нормам и колеблется в пределах 86,0–137,7 мг Cu^{2+} /кг почвы. Повышенный уровень меди обнаруживается в районах, где интенсивно применяются медьсодержащие препараты в качестве фунгицидов. Внесенная в виде фунгицидов медь накапливается в основном в верхнем горизонте почв. Питаясь растениями, выросшими на таких почвах, животные могут потреблять избыточное количество меди. Ионы меди, обладая высокой способностью к диффузии, легко усваиваются в желудочно-кишечном тракте и, в частности, в верхних отделах тонкого кишечника [7]. Исходя из того, что ионы меди легко реагируют с аминокислотными остатками белков и, в частности, ферментов, а медь сильнее связывается по сравнению с другими катионами и вытесняет их при образовании комплексных соединений, это дает основание предполагать о возможном влиянии ионов Cu^{2+} на каталитическую активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника. В этой связи в качестве объекта наших исследований была выбрана щелочная фосфатаза тонкого отдела кишечника синицы большой (*Parus major* L.).

Синица большая представляет собой один из широко распространенных видов птиц в нашей республике, ее численность стабильна и составляет 1500000–1700000 пар [9]. Связь синицы большой с человеком проявляется в использовании кормов антропогенного происхождения, которые в зимний период составляют основу питания вида и определяют характер территориального размещения особей. Это является одной из причин гнездования синицы большой вблизи жилья человека, и она может устраивать гнезда в самых неожиданных местах.

Территориальное поведение синицы большой характеризуется отсутствием строгой оседлости и способностью предпринимать кочевки в поисках кормовых мест. При наличии богатых источников питания происходит концентрация особей. Зимой большинство синиц покидает лесные массивы и скапливается в населенных пунктах. Уход на зиму из лесов к жилью человека, часто на десятки километров, приобретает характер сезонных кочевков.

Основу питания больших синиц составляют гусеницы и яйца бабочек, жуки и в значительном количестве семена. Следует отметить сезонную изменчивость в питании большой синицы. В летний период резко возрастает количество потребляемых гусениц чешуекрылых, равнокрылых, жуков и пауков. Кроме того, они охотно кормятся на трупах животных. В зимний период резко возрастает потребление семян. Подводя итог краткому описанию синицы большой, следует отметить, что излюбленными местами обитания этой птицы являются сады и парки, дачные поселки и небольшие озелененные города, где чаще всего применяются медьсодержащие фунгициды.

Разработка научно обоснованных природоохранных мероприятий в связи с загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами (свинцом, кадмием, медью и др.) может базироваться на знаниях о влиянии этих металлов на ор-

ганизм животных. В этой связи синица большая представляет удобный объект экологических исследований.

Целью наших исследований было изучение механизма ингибирования щелочной фосфатазы тонкого отдела кишечника синицы большой ионами меди и возможности использования этого фермента как индикатора загрязнения окружающей среды ионами меди.

Имеется около двух десятков методов определения активности щелочной фосфатазы с использованием различных субстратов и буферных систем с широким интервалом pH, в которых предлагается время инкубации от 15 минут до 48 часов. Наибольшее распространение получили методы Бодански, Кинга, Армстронга, Бессея, Лоури, Брокко, которые используются в различных модификациях [4, 10, 11].

В своей работе мы использовали метод Бодански, разработанный для определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови человека. Принцип метода состоит в том, что β -глицерофосфат под действием щелочной фосфатазы подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфата, по интенсивности отщепления которого судят об активности фермента. Неорганический фосфат определяли по Фиске–Суббороу в модификации Островского [12].

Однако по прописи Бодански определить активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника синицы большой не представилось возможным, и нам пришлось экспериментальным путем разрабатывать условия определения активности фермента в изучаемой ткани. Необходимо было подобрать концентрацию субстрата и разведение гомогената тонкого отдела кишечника. Для решения данного вопроса изучали динамику фосфатазной реакции при различных концентрациях субстрата и разведениях гомогенатов, заменив при этом инертный барбиталовый буфер активирующим трис-буфером (pH 9,0).

Гомогенаты и субстрат готовили на трис-буфере. Инкубационную смесь готовили из 0,1 мл гомогената, в котором разведение ткани было 50-кратным и 0,9 мл β -глицерофосфата 1–16 миллимолярной концентрации. Инкубирование проводили при температуре 38°C в течение 1, 2, 4, 8 и 16 минут. К каждой опытной пробе ставили контроль, где субстрат вносили после осаждения белков гомогената. В безбелковых центрифугатах определяли концентрацию неорганического фосфата. Результаты исследований подвергали математической обработке методом прямых разностей [13, 14] с использованием компьютерной программы.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что динамика фосфатазной реакции в тонком отделе кишечника синицы большой имеет форму кривой, характерную для большинства ферментативных реакций (рис. 1).

Скорость ферментативной реакции со временем уменьшается, что можно объяснить снижением степени насыщения фермента субстратом по мере его использования в ходе реакции и возможностью ингибирования фермента продуктами реакции, в частности, неорганическим фосфатом. Анализ полученных экспериментальных данных показал, что начальная скорость фосфатазной реакции имеет прямую зависимость в течение 2 минут инкубации при 14 миллимолярной концентрации β -глицерофосфата в инкубационной среде и разведении гомогенатов тонкого отдела кишечника в 500 раз. Это позволило нам определять активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника в течение первых двух минут при указанном разведении ткани и концентрации β -глицерофосфата в реакционной среде.

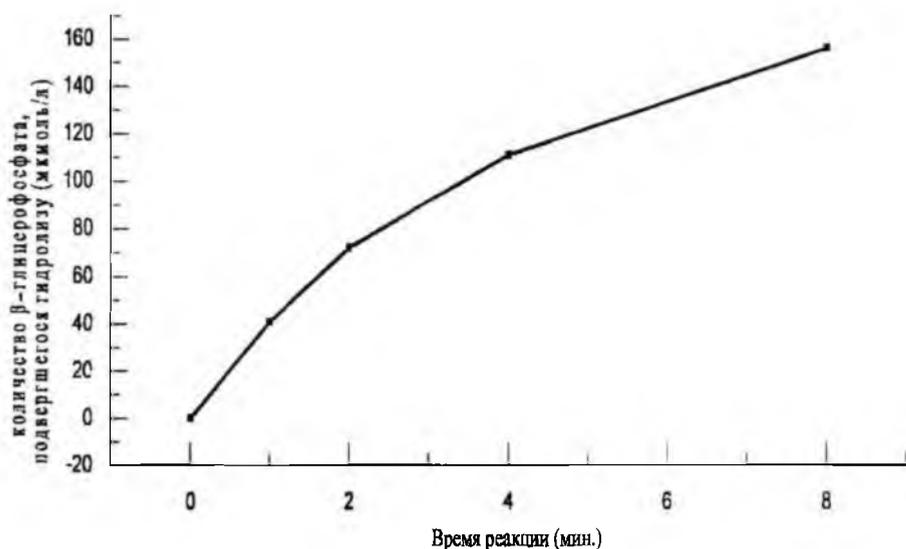


Рис. 1. Динамика фосфатазной реакции в тонком отделе кишечника.

Исследования по влиянию ионов меди на активность щелочной фосфатазы проводили в тех же условиях, но дополнительно в инкубационную смесь вносили ионы меди в концентрациях 4; 40; 400 и 4000 мг/л. Полученные данные об активности щелочной фосфатазы под воздействием ионов меди представлены в табл.

Таблица

Влияние ионов меди на активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника синицы большой

Концентрация ионов меди, мг/л	Активность, нкат/г ткани	Снижение активности, нкат/г ткани	% к исходной активности	P
0	579,35 ± 13,62	0	100	—
4	524,30 ± 7,42	- 55,05 ± 7,78	90,50	< 0,01
40	479,88 ± 6,14	-99,47 ± 13,62	82,83	< 0,02
400	437,20 ± 8,36	-142,15 ± 11,40	75,46	< 0,02
4000	369,50 ± 12,62	-209,85 ± 24,28	63,78	< 0,001

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют, что ионы Cu^{2+} оказывают ингибирующее действие на активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника синицы большой.

Внесение ионов Cu^{2+} в реакционную среду в концентрации 4 мг/л вызывает снижение активности щелочной фосфатазы на 9,5%. Последующее увеличение концентрации ионов Cu^{2+} в 10, 100 и 1000 раз сопровождается падением активности фермента на 17,77; 24,54 и 36,22% соответственно. Отсутствие четкой зависимости между степенью ингибирования щелочной фосфатазы и концентрацией ионов меди в реакционной среде дает возможность предположить, что изменение активности связано с изменениями в активном центре фермента.

Исходя из общих представлений о строении активного центра и механизма действия щелочной фосфатазы (рис. 2) влияние ионов меди на ее активность, возможно, связано с преобразованиями, происходящими в активном центре фермента (рис. 3).

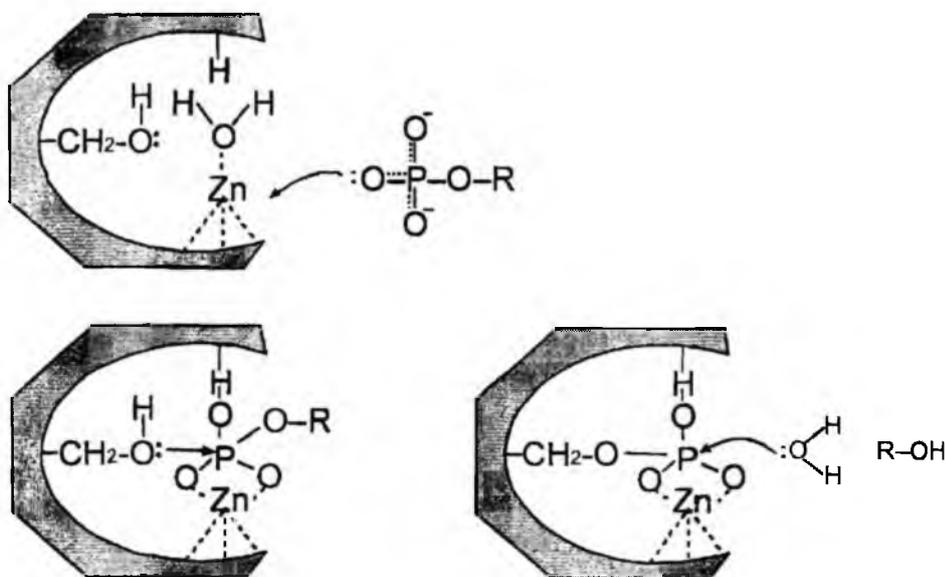


Рис. 2. Механизм действия щелочной фосфатазы [6].

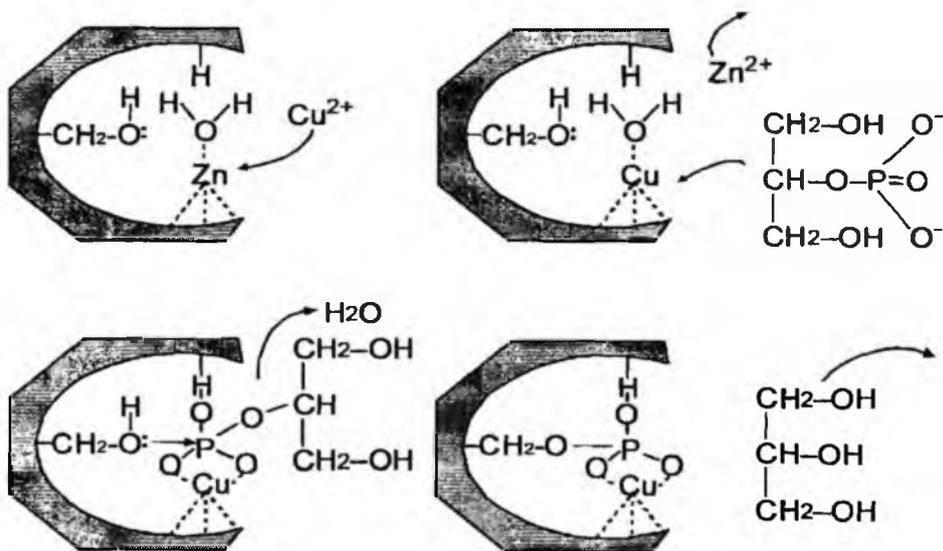


Рис. 3. Механизм ингибирующего действия ионов меди на щелочную фосфатазу.

Известно, что на первой стадии фосфатазной реакции происходит взаимодействие молекулы субстрата с ионами цинка активного центра щелочной фосфатазы, сопровождающееся вытеснением молекулы воды из комплекса с металлом. Кроме воды, лигандами цинка служат остатки гистидина

и тирозина, но информация о центрах присоединения цинка на ферменте далеко не полная.

На второй стадии гидроксильная группа серина атакует фосфорильный атом производного фосфата. В результате образуется комплекс – фосфорилфермент, а сам процесс взаимодействия называется фосфорилированием. Прочность связи фосфата с металлоферментом довольно велика, константа устойчивости которого равна 10^6 M^{-1} . После фосфорилирования происходит нуклеофильная атака образовавшегося фосфорилфермента. В качестве нуклеофила выступает молекула воды. До нуклеофильной атаки атом фосфора в фосфорилферменте находится в sp^3 -гибридном состоянии. Нуклеофильная атака сопровождается образованием пентакоординационного промежуточного продукта в dsp^3 -гибридном состоянии. Такой промежуточный продукт имеет геометрию, характерную для пяти электронных пар, расположенных вокруг центрального атома фосфора – геометрию тригональной бипирамиды. Причем, многие стабильные пятикоординационные соединения фосфора принимают такую конфигурацию. Например, газообразный пентахлорид фосфора имеет структуру тригональной бипирамиды.

В дальнейшем субстрат β -глицерофосфат вытесняет молекулу воды из комплекса с металлом. Гидроксильная группа серина атакует фосфорильный атом присоединившегося производного фосфата. В результате нуклеофильной атаки может образоваться медьсодержащий фосфорилфермент, по всей видимости, термодинамически более устойчивый, чем фосфорилфермент, имеющий в активном центре Zn^{2+} . В связи с тем, что фосфорильная группа прочно связана с серином и ионами меди, то вполне вероятно, что фосфорилфермент не способен к дефосфорилированию. Например, Cd^{2+} - и Mn^{2+} -фосфатазы очень прочно присоединяют фосфат с образованием фосфорилфермента с полной потерей каталитической активности, в то время как для Zn^{2+} -фермента процесс дефосфорилирования протекает легко и быстро.

В заключение следует отметить, что ингибирующее действие ионов Cu^{2+} на активность щелочной фосфатазы тонкого отдела кишечника синицы большой обусловлено, по всей вероятности, образованием медьсодержащего фосфорилфермента, который с трудом подвергается дефосфорилированию или вовсе не способен к данной реакции. Активность щелочной фосфатазы в тонком отделе кишечника птиц естественных популяций может быть индикатором загрязнения окружающей среды ионами меди.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Номенклатура ферментов* / Под ред. **А.Е. Браунштейна**. – М., 1979. – 321 с.
2. **Шубин М.Г., Нагаев Б.С.** Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. – М., 1980. – 224 с.
3. **Диксон М., Узбб Э.** Ферменты. – М., 1966. – 816 с.
4. *Клиническая ферментология* / Под ред. **Э. Щеклика**. – Варшава, 1966. – 461 с.
5. **Бреслер С.Е.** Введение в молекулярную биологию. – М.–Л., 1966. – 517 с.
6. *Неорганическая биохимия* / Под ред. **Г. Эйхгорна**. – М., 1978. – Т. 1. – 712 с. – Т. 2. – 736 с.
7. **Георгиевский В.И., Ананенков Б.Н., Самохин В.Т.** Минеральное питание животных. – М., 1979. – 471 с.
8. **Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М.** Поступление меди в растения и распределение в клетках, тканях и органах // Успехи современной биологии, 2001. – Т. 121, № 2. – С. 190–197.
9. **Никифоров М.Е., Козулин А.В., Гричик В.В., Тишечкин А.К.** Птицы Беларуси на рубеже 21 века: статус, численность, распространение. – Мн., 1997. – 188 с.
10. **Тодоров И.** Клинические лабораторные исследования в педиатрии. – София, 1968. – 1664 с.

11. **Камышников В.С.** Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. – Т. 1. – Мн., 2000. – 495.: ил.
12. **Биохимические методы исследования в клинике** / Под ред. **А.А. Покровского**. – М., 1969. – 651 с.
13. **Кокунин В.А.** Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биох. журн., 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776–791.
14. **Асатиани В.С.** Новые методы биохимической фотометрии. – М., 1965. – 543 с.

S U M M A R Y

Copper (II) ions inhibit enzyme alkaline phosphatase in small intestine of Parus major. No connection was found between the level of enzyme inhibition and the concentration of copper ions. Possible mechanism of inhibitory action of copper ions on alkaline phosphatase by substitution zinc ions by copper ions is presented. Inhibitory action of copper ions is probably performed by formation of copper containing phosphoryl enzyme with no possibility for dephosphorylation. Alkaline phosphatase activity in small intestine of birds of natural populations can be the indicator of environment pollution with copper ions.

Поступила в редакцию 12.09.2006