

В. В. ЕГОРОВА, В. Г. ГРЕДИН,
член-корреспондент АН СССР А. М. УГОЛЕВ

**ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА
НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ
ФЕРМЕНТОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ МЕМБРАННОЕ
ПИЩЕВАРЕНИЕ**

Обнаружено, что многие ферменты, обеспечивающие протекание мембранного пищеварения, являются регулируемыми (¹⁻³). В частности, показано, что в качестве регуляторов ферментативной активности могут выступать продукты данной ферментативной реакции, а также субстраты и продукты параллельных ферментативных цепей. В ряде случаев (например, для щелочной фосфатазы и γ -амилазы) было установлено (^{1, 4, 5}), что такие эффекты можно объяснить на основании концепции аллостерического регулирования (⁶⁻¹¹).

Благодаря регулированию ферментативной активности на стадии мембранного пищеварения (в частности, за счет торможения гидролиза одних субстратов, например пептидов, другими, например липидами) обеспечиваются такие важные в физиологическом отношении эффекты, как наиболее благоприятное распределение пищеварительных и транспортных функций вдоль тонкой кишки за счет эффективной и согласованной работы ее пищеварительно-транспортного конвейера (^{1, 6}).

Однако до настоящего времени не решен вопрос о том, меняются или остаются неизменными регуляторные свойства аллостерических ферментов мембраны цеточной каймы в условиях экспериментальной и клинической патологии.

Ранее нами была высказана гипотеза (¹), что некоторые патологические изменения, наблюдаемые в клинике, могут получить объяснение, если допустить усиление в одних случаях и ослабление в других регуляторных свойств собственно кишечных ферментов.

В настоящей работе приводятся первые экспериментальные данные о том, что при патологии действительно происходит изменение регуляторных свойств ферментов на примере γ -амилазы (КФ 3.2.1.3) тонкой кишки. В качестве модели патологии был выбран иммобилизационный стресс — один из видов стресса этого типичного для самых разнообразных заболеваний состояния*. В предшествующей работе (¹³) было продемонстрировано, что через сутки после иммобилизационного стресса наблюдались нарушения синтеза и транслокации некоторых пептидаз и карбогидраз в энтероците. Однако регуляторные характеристики ферментов в этих условиях, как уже было отмечено ранее, не изучались.

Опыты были проведены на 48 белых крысах-самцах линии Вистар, весом около 200 г, предварительно голодавших 18—20 час. Иммобилизационный стресс вызывался фиксацией крыс в специальных клетках в течение 24 час. (¹³). Контролем служили животные того же пола и возраста, не подвергавшиеся стрессорному воздействию. В каждой серии экспериментов использовалось 6 опытных и 6 контрольных животных. γ -Ами-

* В этой работе понятие стресс используется в его классическом смысле, т. е. как синдром неспецифической адаптации организма к различным экстремальным воздействиям (¹²).

лазная активность (после удаления α -амилазы с поверхности тонкой кишки) определялась в гомогенатах проксимального отдела слизистой тонкой кишки через 4, 24, 48, 72 и 168 час. (7 суток) после стрессорного воздействия. рН-функция γ -амилазы изучалась через 24 часа после окончания иммобилизации. Активность γ -амилазы определялась по приросту образующихся гексоз модифицированным методом Нельсона (¹⁴). В качестве субстрата использовался раствор растворимого крахмала (20 мг/мл), модификатора — эмульсия трибутирина (6,6 мМ). Растворы готовились на К-фосфатном буфере (рН 7,0). рН-Функция γ -амилазы определялась в диапазоне 4—10, с точностью $\pm 0,1$. Инкубация проводилась при 37°.

На рис. 1 представлены данные по влиянию иммобилизационного стресса на активность γ -амилазы проксимального отдела тонкой кишки крыс и ее торможение трибутирином. Наибольшее снижение γ -амилазной активности наблюдается через 24 часа после стресса, через 48 час. активность достоверно не отличается от контрольной, повторно снижается через 72 часа и, наконец, через 7 суток после стресса возвращается к исходному уровню. Эти данные согласуются с результатами других исследований (¹³), наблюдавших уменьшение ферментативной активности под влиянием стресса. Однако, как можно видеть, имеет место не только снижение каталитической активности за счет нарушения синтеза и транслокации ферментов, но и изменение их регуляторных характеристик. Действительно, уже через 4 часа после стресса наблюдается тенденция к увеличению тормозных эффектов трибутирина. Наиболее существенное увеличение торможения отмечается через 24 часа после иммобилизационного стресса (43,0 до 56,0%, $P < 0,05$). В более поздние сроки величина торможения приближается к контрольной.

Итак, мы видим, что в некоторые периоды после стресса происходят не только уменьшение активности, но и достоверные изменения эффектов модификатора. Интересно сопоставить динамику изменений каталитических и регуляторных свойств γ -амилазы. Из рисунка видно, что максимальное снижение ферментативной активности через 24 часа после стресса соответствует максимальному увеличению эффектов трибутирина. Нормализация активности через 48 час. совпадает с нормализацией величины торможения трибутирином. Однако при повторном снижении активности через 72 часа после стресса изменений тормозных эффектов мы не обнаружили. Возможное значение сочетанных нарушений каталитической активности и регуляторных свойств можно оценить на основании следующих расчетов: в контроле трибутирин тормозит активность γ -амилазы на 43%, т. е. в этом случае сохраняется 57% от активности без модификатора, принятой за 100%. Через 24 часа после стресса каталитическая активность снижается до 69% по сравнению с контролем. В присутствии модификатора активность падает еще более, чем в два раза, составляя лишь 32% от γ -амилазной активности контрольных животных в отсутствие модификатора. Ясно, что в данных условиях нарушение пищеварения при стрессе углубляется за счет повышения чувствительности фермента к отрицательному модификатору.

Обращает на себя внимание тот факт, что изменение каталитической активности и регуляторных свойств γ -амилазы под влиянием иммобилизационного стресса происходит неодинаково при различных значениях рН среды. На рис. 2 представлены кривые, характеризующие рН-функцию γ -амилазы в контроле и опыте. Как можно видеть, под действием стресса наблюдается смещение рН-оптимума γ -амилазы из нейтральной (рН 7,0) в более кислую область (рН 6,0). Регуляторные свойства γ -амилазы также значительно изменяются с изменением рН среды (рис. 2). При этом изменения различны в контроле и у животных через 24 часа после иммобилизационного стресса. Из рис. 2 видно, что в контроле наибольший тормозной эффект трибутирина наблюдается при рН 6,0. В щелочной области ингибирование активности сменяется стимуляцией. Ана-

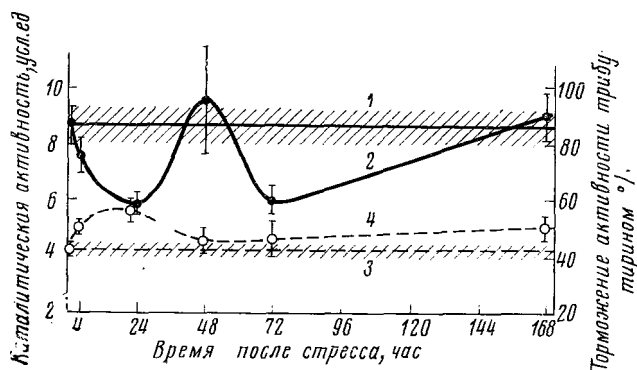


Рис. 1. Влияние иммобилизационного стресса на каталитическую активность и регуляторные свойства γ -амилазы тонкой кишки крыс. 1, 3 — контроль; 2, 4 — опыт

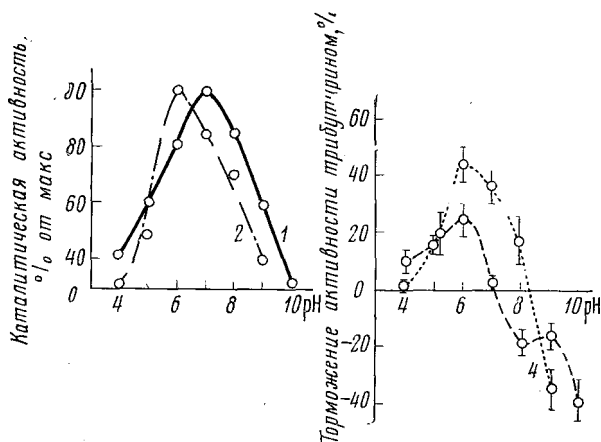


Рис. 2. Влияние иммобилизационного стресса на pH-функцию γ -амилазы тонкой кишки крыс. 1, 3 — контроль; 2, 4 — опыт

логичные данные были получены при исследовании влияния трибутирина на pH-функцию глицил-1-лейцин дипептидазы (¹). После иммобилизационного стресса торможение трибутирином отмечается в более широком диапазоне значений pH. При этом величина торможения активности γ -амилазы трибутирином при pH 6,0—8,0 достоверно выше, чем в контроле.

Таким образом, регуляторные свойства γ -амилазы зависят от pH среды, причем эта зависимость изменяется под влиянием иммобилизационного стресса.

Сопоставим полученные нами данные с первоначальной гипотезой о том, что именно нарушения регуляторных свойств ферментов могут играть определенную роль в развитии некоторых патологических явлений, наблюдаемых в клинике. Допустим, что на фоне компенсированной ферментативной недостаточности субстрат поступает в кишку вместе с модификатором, вызывающим торможение. Тогда уровень ферментативной активности может становиться ниже критического, что способствует возникновению временного, но совершенно реального ферментативного дефекта. Ясно, что в этом случае синдром интолерантности провоцируется за счет изменения не только каталитических, но и регуляторных свойств. По-видимому, такой генез наблюдается при многочисленных и

разнообразных диететических погрешностях. Опасность сверхкритического падения ферментативной активности возрастает, если помимо угнетения синтеза и транслокации данного фермента происходит сенсibilизация к отрицательным модификаторам.

Естественно возникает вопрос, как представить себе механизм изменений регуляторных свойств пищеварительных ферментов. Возможные гипотезы были подробно рассмотрены нами ранее (¹, ⁵). Наиболее простая из них базируется на твердо установленном факте существования различных изоэнзимных форм (¹⁵) пищеварительных (собственно кишечных) ферментов. Мы предполагаем, что различные изоэнзимы могут обладать неидентичными регуляторными свойствами. При патологии количественные изменения в соотношении отдельных изоэнзимов могут приводить к изменению регуляторного спектра ферментов: сенсibilизации (повышению чувствительности к действию модификаторов), если начинает преобладать изоэнзим с высокой чувствительностью к действию модификатора, и десенсibilизации (понижению чувствительности), если преобладает изоэнзим с низкой чувствительностью к действию модификатора.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
9 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Уголев, Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция, Л., «Наука», 1972. ² А. М. Ugolev, N. N. Jesuitova et al., Gastroenterologie, v. 10, 2, 452 (1967). ³ Н. М. Тимофеева, Н. Н. Иезуитова и др., ДАН, т. 176, № 6, 1451 (1967). ⁴ А. М. Уголев, А. А. Груздков и др., Физиол. журн. СССР, т. 10, 2, 240 (1974). ⁵ А. М. Ugolev, A. A. Gruzdkov et al., Nahrung, v. 19, 4, 299 (1975). ⁶ J. Monod, J.-P. Changeux, F. Jacob, J. Mol. Biol., v. 6, 306 (1963). ⁷ J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, J. Mol. Biol., v. 12, 1, 88 (1965). ⁸ D. E. Atkinson, In: Current Topics in Cell. Regulation, N. Y.—London, 1969, p. 1, 29. ⁹ D. E. Koshland, In: The Enzymes, v. 1, 1970, p. 341. ¹⁰ Аллостерические ферменты (под ред. В. Л. Кротовича), М., 1975. ¹¹ R. W. Jones, Principles of Biological Regulation, N. Y.—London, 1973. ¹² Г. Селье, На уровне целого организма, М., «Наука», 1972. ¹³ А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева и др., ДАН, т. 188, № 2, 489 (1969). ¹⁴ А. М. Уголев, Н. Н. Иезуитова, В кн.: Исследование пищ. аппарата у человека, Л., «Наука», 1969, стр. 192. ¹⁵ Дж. Уилкинсон, Изоферменты, М., «Мир», 1968.