

МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСАХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГАМЕТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Ион БАЛАН, Георгий БОРОНЧУК

Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы

Membranele plasmatice ale spermatozoizilor de taur, berbec, vier și cocoș au fost separate cu ajutorul sistemului polimeric bifazic-dextran/polietylenglicol. Rezultatele demonstrează că temperaturile joase acționează nefavorabil asupra activității adenzintrifosfatazei, fosfatazei alcaline și 5'-nucleotidazei. Au fost stabilite deosebiri interspecifice ale modificărilor acțiunilor intermoleculare în complexele substrat-enzimatic.

Plasma membranes have been isolated from bull, ram, boar and cock spermatozoa bay using a two-phase polymeric system dextran-polyethylenglycol. The results have shown that the low temperatures influenced unfavourably on the activity of adenosintrifosphatase alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase. Interspecific differences of these modifications intermolecular actions in substrat-enzematic complexes have been determined.

Нековалентные связи, обеспечивающие межмолекулярные взаимодействия, принимают участие и в связывании субстрата с ферментом с образованием фермент-субстратных комплексов. При этом субстрат связывается с ферментом в определенной области молекулы фермента, называемой активным центром, где осуществляется катализируемая ферментом реакция и образуются ее продукты. Указанный комплекс образуется тогда, когда субстратный “ключ” соответствует ферментному “замку”. Следует отметить, что фермент-субстратный комплекс образуется посредством водородных связей между субстратом и группами, расположенными в самых различных участках аминокислотной последовательности фермента [2].

Молекула белка сложена таким образом, что реакционноспособные группы в боковых цепях нескольких аминокислотных остатков фермента образуют в высшей степени специфическую пространственно-организованную конструкцию, точно отвечающую конфигурации субстрата. Поскольку в среднем в молекуле субстрата расположено значительно меньше, чем общее число аминокислотных остатков в молекуле фермента, принято считать [8], что непосредственное участие в функционировании активного центра фермента принимает только его небольшая часть. У массивных ферментов может быть несколько активных центров. Большинство аминокислотных остатков, не входящих в активный центр, определяет характер складывания пептидной цепи и пространственное положение одной части цепи относительно другой, в результате чего и создается активный центр фермента.

Селективность фермент-субстратных взаимодействий в биологических системах зависит от многостадийных физико-химических процессов, на этапах которых важная роль отводится слабым межмолекулярным силам [5].

В исследованиях межмолекулярных взаимодействий в фермент-субстратных комплексах важное значение приобретает изучение активности Na/K магнийзависимой АТФ-азы, осуществляющей активный выброс из клеток ионов натрия и аккумуляцию ионов калия [2,3].

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на плазматических мембранах гамет быков, баранов, хряков и петухов. Выделение плазматических мембран проведено с использованием двухфазной полимерной системы методом, модифицированным сотрудниками нашей лаборатории. Активность мембранносвязанных ферментов определяли по Ivanov N., Profirov I. [7].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Ферменты являются наиболее важными катализаторами в биологических системах. Их чрезвычайно высокая эффективность и специфичность в значительной степени обусловлены сочетанием слабых меж-

молекулярных взаимодействий со структурными особенностями реакционных центров, влиянием очень сильных локальных электрических полей и своеобразным сочетанием энтропийных и энтальпийных эффектов [5].

Выполненные исследования по определению активности ферментов $Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ АТФ-азы, 5^1 -нуклеотидазы и щелочной фосфатазы плазматических мембран гамет быка, барана, хряка и петуха показали, что охлаждение, замораживание и оттаивание семени по-разному воздействует на них (табл.).

Таблица

Активность $Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ АТФ-азы, 5^1 -нуклеотидазы и щелочной фосфатазы плазматических мембран гамет животных, И.Е.

Этап технологической обработки	$Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ АТФ-аза	5^1 -нуклеотидаза	Щелочная фосфатаза
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Бык, n = 8			
Разбавление (контроль)	27,52 ± 3,99	16,43 ± 2,12	0,85 ± 0,11
Оттаивание	23,40 ± 2,27	19,90 ± 1,30	1,67 ± 0,16*
Баран, n = 8			
Разбавление (контроль)	25,02 ± 2,27	1,77 ± 0,25	1,85 ± 0,05
Оттаивание	22,64 ± 1,87	1,56 ± 0,38	1,47 ± 0,06*
Хряк, n = 8			
Разбавление (контроль)	28,03 ± 1,30	4,49 ± 0,98	3,02 ± 0,36
Оттаивание	18,85 ± 1,43*	3,17 ± 0,66	2,48 ± 0,37
Петух, n = 5			
Разбавление (контроль)	16,23 ± 2,20	8,09 ± 0,86	1,19 ± 0,08
Оттаивание	9,57 ± 0,56*	7,39 ± 0,59	1,17 ± 0,06

*Различия статистически достоверны.

Так, в изолированных плазматических мембранах гамет быка, барана и петуха активность $Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ АТФ-азы практически не изменяется, тогда как в мембранах гамет хряка активность данного фермента значительно снижается. Результаты исследований активности $Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ АТФ-азы в мембранах свежеразбавленных гамет, а также после замораживания и оттаивания гамет хряка, свидетельствуют о существенных разрушениях плазматических мембран гамет этого вида животных. Поскольку данная ферментативная система выполняет роль трансформатора энергии, аккумулированной в АТФ для активного транспорта ионов натрия из клетки и создания градиента концентрации ионов натрия и калия в мембране, выявленные изменения активности $Mg^{+2}(Na^{+}+K^{+})$ -АТФ-азы указывают на значительные повреждения плазматических мембран гамет хряка.

В мембранах же гамет быка, барана и петуха после замораживания и оттаивания семени активность данного фермента не претерпевает существенных изменений, что говорит о прочной связи фермента с плазматической мембраной.

Активность 5^1 -нуклеотидазы в изолированных богатых фракциях плазматических мембран гамет быка выше, чем в гаметах остальных видов животных. Однако после замораживания и оттаивания семени не происходит значительного изменения активности данного фермента, что подтверждает высокую устойчивость ядерных элементов гамет к действию факторов внешней среды.

Среди ферментов, связанных с плазматической мембраной, находится и щелочная фосфатаза, которая участвует в механизме реализации физиологического действия цАМФ путем освобождения ортофосфата из фосфорилированных белковых субстратов. Проведенные исследования выявили существенные особенности активности данного фермента в мембранах свежеполученных гамет быка, барана, хряка и петуха. Так, активность щелочной фосфатазы в мембранах гамет барана, хряка и петуха выше, чем в мембранах гамет быка. После замораживания и оттаивания семени в плазматических мембранах гамет быка увеличивается активность щелочной фосфатазы по сравнению с активностью указанного

фермента в препаратах из свежеполученных гамет, в мембранах гамет барана – снижается, а хряка и петуха – остается почти на одном и том же уровне.

Анализ видовых особенностей активности мембраносвязанных ферментов гамет животных свидетельствует о том, что щелочная фосфатаза и 5¹-нуклеотидаза являются наиболее видоспецифичными ферментами, активность которых колеблется, соответственно, от 0,85±0,11 у быка до 3,0±0,36 у хряка и от 1,8±0,25 у барана до 16,4±2,12 И.Е. у быка. В свою очередь активность Mg⁺²(Na⁺+K⁺)АТФ-азы не носит такого характера и в процессе технологической обработки мембран гамет при криоконсервации не претерпевает существенных изменений.

Приведенные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым криповреждения сопровождаются повышением активности АТФ-аз и выходом в окружающую среду продуктов их гидролиза. Вместе с тем, в стабилизации активного центра и организации энзим-субстратного комплекса субстрат связывается с энзимом посредством водородных связей, которые служат проводниками передачи энергии от субстрата к энзиму, после чего третичная структура энзима теряет глобулярную и приобретает аглобулярную форму. Параллельно идет превращение пептидной связи субстрата в диполь [1]. Влияние криопротекторов на биохимические реакции в живой клетке часто рассматривают односторонне: принимаются во внимание лишь эффекты, связанные со структурой водного растворителя и гидратацией белка. Но может быть и другого рода воздействие, в частности – увеличение вязкости растворителя может существенно влиять на внутримолекулярную динамику белка. Влияние вязкости на ферментативную кинетику согласуется с представлением о непосредственной связи между динамикой растворителя и конформационными движениями белка, обусловленными с каталитической стадией [6,4].

Таким образом, исследования активности мембраносвязанных ферментов гамет быка, барана, хряка и петуха представляют определенный теоретический и практический интерес. Они позволяют получить данные по химическому составу мембран, определить сохранность межмолекулярных взаимодействий в фермент-субстратных комплексах, выявить определенные взаимосвязи между содержанием и соотношением структурных компонентов мембран и устойчивостью гамет указанных видов животных к действию низких температур.

Литература:

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. - Киев: Наукова Думка, 1994. - 431 с.
2. Болдырев А.А. Матриксная функция биологических мембран // СОЖ. - 2001. - Том 7. - №7. - С.2-8.
3. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. - Кишинэу: Типогр. АН Молдовы, 2003. - 336 с.
4. Демченко А.П., Каменчук О.И. Ферментативная кинетика в присутствии криопротекторов. Влияние вязкости среды. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тезисы Междунар. конф. - Харьков, 1988, с.15.
5. Хобза П., Заградник Р. Межмолекулярные комплексы. - Москва: Мир, 1989. - 375 с.
6. Critser J, Benson J. Fundamental criobiology// Цитология. - 2004. - Том 46. - №9. - С.758-759.
7. Ivanov N., Profirov J. Isolation of plasma membranes from ram spermatozoa by a two-phase polymer System // T. Reprod. Fert. - 1981. - Vol.63. - No1. - P.25-29.
8. Yudkin M., Offord R. Guidebook to Biochemistry. - London: Cambridge University Press, 1971. - 680 p.

Prezentat la 15.01.2007