

А. А. СИМОНЯН, Р. А. СТЕПАНЯН, Г. Г. БАТИКЯН

АКТИВНОСТЬ АТФазы РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПТИЦ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Гомогенат и отдельные субклеточные фракции—митохондрии и надосадочная жидкость мозга куриного эмбриона в различные периоды развития обладают неодинаковой степенью АТФазной активности, стимулируемой Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , а также 2,4-динитрофенолом (ДНФ). Трехкратное замораживание и оттаивание препаратов мозговой ткани по-разному влияют на активность фермента.

Локализация АТФазы в различных клеточных фракциях головного мозга такая же, как и в других тканях [7]. Активность фермента обнаруживается во всех клеточных фракциях [1, 2, 13, 14], в наибольшей степени (около 60%) сосредоточена в митохондриях, что подтверждается и при расчете на мг митохондриального белка [5, 7, 12]. Исследования куриного эмбриона на самых ранних стадиях развития показали заметное увеличение активности АТФазы в вителлин-плазматической мембране во время овуляции [8]. Из мембранного комплекса нами выделена фракция, обладающая АТФазной активностью, которая выделена из неоплодотворенных яиц, хотя и отличается по ряду свойств от таковой, присутствующей в оплодотворенных яйцах. Ранее нами была показана относительно низкая степень общей АТФазной активности в мозге кур в начале плодного периода эмбрионального развития, которая по ходу развития постепенно повышается [4]. После вылупления цыпленка величина активности фермента в мозге вновь снижается до минимума.

Исходя из полученных результатов, мы изучали динамику активности АТФазы в клеточных фракциях головного мозга кур на различных стадиях эмбрионального и раннего постэмбрионального развития и влияние на нее некоторых катионов и ДНФ.

Материал и методика. Гомогенизация ткани мозга проводилась в растворе 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НСI буфера в соотношении 1:10, рН 7,4 [6, 15]. В каждую пробу добавлялся гомогенат, соответствовавший 2 мг белка. Выделение митохондриальной фракции проводилось по методу Манделя и сопр. [11] с некоторыми видоизменениями. Осадок митохондрий суспендировался в растворе 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НСI буфера в соотношении 1:2. В каждую пробу добавлялись митохондрии, соответствовавшие 2—3 мг белка. Надосадочная жидкость ткани мозга отделялась центрифугированием гомогената при 22000g в течение 20 мин [13]. АТФазная реакция исследовалась как в свежевыделенных, так и в трехкратно замороженных (при -15°) и оттаянных препаратах ткани мозга.

АТФазная активность в мозге определялась по нарастанию количества неорганического фосфата в инкубационной смеси (объем 2 мл, рН 7,4) следующего состава: 1,6 мл 25 мМ трис-НСI буфера, 0,2 мл гомогената, митохондрий или надосадочной жидкости.

4 мг (в 0,2 мл) АТФ (Sigma), нейтрализованной трисом. Время инкубации—20 мин. температура 37°. Катионы добавлялись в ммольях с конечной концентрацией K^+ —120, Na^+ —100, Mg^{2+} —10, Ca^{2+} —20. ДНФ применялся в количестве 0,0005 М. Неорганический фосфат определялся по методу Лоури и Лопез [9]. Полученные данные пересчитывались на мг белка [10].

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о высокой АТФазной активности гомогената ткани мозга 15-дневных эмбрионов в контрольных пробах (без добавления активаторов). Аналогичная активность фермента отмечается в ткани мозга 5-дневных цыплят. Примерно такая же динамика действия АТФазы на различных стадиях развития в гомогенате сохраняется при ее активировании различными катионами и ДНФ.

Таблица 1

Влияние катионов и ДНФ на АТФазную активность в гомогенате ткани мозга куриного эмбриона (Р в мкатах/мг белка) $M \pm m$

Активаторы	Дни развития эмбрионов				5-дневные цыплята	
	15-дневные		20-дневные		свежие	замороженные
	свежие	замороженные	свежие	замороженные		
Контроль (без добавления активаторов)	1,38 \pm 0,01	1,80 \pm 0,06	0,85 \pm 0,04	1,73 \pm 0,09	1,29 \pm 0,05	1,58 \pm 0,04
Na^+ , K^+	1,68 \pm 0,04	1,52 \pm 0,12	1,14 \pm 0,03	1,66 \pm 0,11	1,37 \pm 0,10	1,39 \pm 0,10
Mg^{2+}	1,83 \pm 0,01	1,80 \pm 0,02	1,76 \pm 0,13	1,73 \pm 0,10	1,64 \pm 0,06	1,58 \pm 0,05
Ca^{2+}	1,47 \pm 0,01	1,45 \pm 0,03	1,35 \pm 0,05	1,20 \pm 0,14	1,24 \pm 0,04	1,53 \pm 0,10
ДНФ	1,87 \pm 0,03	1,81 \pm 0,02	1,68 \pm 0,03	1,89 \pm 0,10	1,67 \pm 0,05	1,66 \pm 0,10

В этой и остальных таблицах количество опытов равно 5.

Наивысшее активирование фермента в свежесодержанных гомогенатах мозга птиц в изученные периоды развития наблюдается в присутствии Mg^{2+} и ДНФ.

Небольшое стимулирование действия АТФазы в гомогенате мозга наблюдается под влиянием Na^+ и K^+ . При добавлении Ca^{2+} к мозговым гомогенатам 15- и 20-дневных эмбрионов активность фермента несколько повышается, что не наблюдается в мозге 5-дневных цыплят. В пробах мозговых гомогенатов, подвергнутых трехкратному замораживанию и оттаиванию без добавления активаторов, по сравнению со свежим гомогенатом, прирост активности фермента 15- и 20-дневных эмбрионов и 5-дневных цыплят составляет 30, 100 и 22% соответственно (табл. 1). Совершенно иная картина наблюдается при замораживании и оттаивании гомогената при активировании фермента различными катионами и ДНФ; при этом в присутствии Mg^{2+} активность фермента не меняется. Аналогичная закономерность в активности АТФазы отмечается после замораживания и оттаивания гомогената мозга 15-дневных эм-

брионов и 5-дневных цыплят при наличии в среде Na^+ , K^+ и ДНФ; у 20-дневных эмбрионов активность фермента несколько повышается.

Таблица 2

Влияние катионов и ДНФ на АТФазную активность в митохондриальной фракции ткани мозга куриного эмбриона (Р в мкатомах/мг белка) $M \pm m$

Активаторы	Дни развития эмбрионов				5-дневные цыплята	
	15-дневные		20-дневные		свежие	замороженные
	свежие	замороженные	свежие	замороженные		
Контроль (без добавления активаторов)	2,27 ± 0,16	2,65 ± 0,10	2,15 ± 0,12	2,95 ± 0,40	1,35 ± 0,11	2,37 ± 0,26
Mg^{2+}	2,78 ± 0,05	2,65 ± 0,10	3,10 ± 0,31	2,93 ± 0,14	2,47 ± 0,07	2,37 ± 0,08
Ca^{2+}	2,22 ± 0,05	2,08 ± 0,24	2,14 ± 0,11	2,28 ± 0,10	1,88 ± 0,09	1,86 ± 0,10
ДНФ	2,85 ± 0,05	2,89 ± 0,05	2,57 ± 0,05	3,07 ± 0,11	2,38 ± 0,09	2,49 ± 0,10

Как вытекает из данных, приведенных в табл. 2, активность АТФазы в митохондриальной фракции заметно повышается в присутствии Mg^{2+} (прирост по сравнению с контролем 15- и 20-дневных эмбрионов и 5-дневных цыплят составляет 22, 44 и 80% соответственно). Аналогичному изменению подвергается активность АТФазы при ее стимулировании ДНФ (табл. 2). Небольшое активирование фермента под влиянием Ca^{2+} имеет место в митохондриях мозга цыплят после вылупления.

Замораживание и оттаивание препаратов митохондрий сопровождается определенными изменениями активности АТФазы, стимулируемой различными катионами и ДНФ (табл. 2). В контрольных опытах без добавления активаторов после замораживания митохондриальной фракции активность фермента заметно повышается.

Представляет интерес отсутствие в препаратах митохондрий головного мозга куриных эмбрионов различных возрастных категорий каких-либо изменений активности Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимых АТФаз на фоне замораживания.

ДНФ стимулирует активность АТФазы митохондрий 20-дневных эмбрионов примерно на 20% по сравнению с контролем.

В дальнейшем мы исследовали динамику АТФазной активности в надосадочной жидкости (содержащей микросомы, свободные рибосомы и гиалоплазму) ткани мозга куриного эмбриона в различные периоды развития. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, активность общей и стимулируемой катионами и ДНФ АТФазы в надосадочной жидкости мозга 5-дневных цыплят, по сравнению с 15-дневными эмбрионами, значительно ниже. Интересен также тот факт, что у 15-, 20-дневных эмбрионов и 5-дневных цыплят, в отличие от гомогената и митохондриальной фракции мозга, активность фермента в надосадочной жидкости под влиянием Ca^{2+} повышается, по сравнению с контролем, в 3,3, 3,6 и 6,0 раз. Примерно такое же стимулирование активности фермента

Влияние катионов и ДНФ на АТФазную активность в надосадочной жидкости ткани мозга куриного эмбриона (Р в мкатамах/мг белка) $M \pm m$.

Таблица 3

Активаторы	Дни развития эмбрионов				5-дневные цыплята	
	15-дневные		20-дневные		свежие	замороженные
	свежие	замороженные	свежие	замороженные		
Контроль (без добавления активаторов)	0,67 ± 0,04	0,58 ± 0,06	0,59 ± 0,06	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,57 ± 0,04
Na ⁺ , K ⁺	1,04 ± 0,05	0,90 ± 0,06	0,92 ± 0,07	0,85 ± 0,12	0,57 ± 0,03	0,97 ± 0,09
Mg ²⁺	2,23 ± 0,23	1,86 ± 0,21	1,80 ± 0,11	1,38 ± 0,22	1,90 ± 0,10	1,96 ± 0,17
Ca ²⁺	2,23 ± 0,18	1,99 ± 0,17	2,13 ± 0,17	2,11 ± 0,14	1,98 ± 0,14	2,28 ± 0,20
ДНФ	0,89 ± 0,04	0,55 ± 0,10	0,60 ± 0,03	0,58 ± 0,10	0,57 ± 0,09	0,73 ± 0,08

отмечается и в присутствии Mg²⁺. Повышение активности АТФазы минимальное при добавлении Na⁺, K⁺, а также ДНФ. В контрольных опытах, в отличие от гомогената и митохондриальной фракции, в надосадочной жидкости мозга 15- и 20-дневных эмбрионов при замораживании и оттаивании активность АТФазы заметно снижается и повышается у 5-дневных цыплят. Эта закономерность сохраняется при стимулировании фермента отдельными катионами и ДНФ.

При сопоставлении полученных данных видно, что как в эмбриональном, так и постэмбриональном периодах развития кур высокой АТФазной активностью обладают митохондрии головного мозга, затем гомогенат и надосадочная жидкость. В митохондриях и гомогенате высшее стимулирование фермента отмечается в присутствии Mg²⁺ и ДНФ, а в надосадочной жидкости — Ca⁺.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что гомогенат и отдельные субклеточные фракции мозга куриного эмбриона в различные периоды развития обладают неодинаковой степенью АТФазной активности, стимулируемой катионами и ДНФ. Трехкратное замораживание и оттаивание препаратов ткани мозга по-разному влияют на активность фермента.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 18.VII 1974 г.

Ա. Ա. ՍԻՐՈՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Գ. Հ. ԲԱՏԻՎՅԱՆ

ԹԹԶՈՒՆՆԵՐԻ ԳԼԵՈՒԴԵՂԻ ԲԶԶԱՅԻՆ ՏԱՐԲԵՐ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ
ԱՏՖազային ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՄԲՐԻՈԳԵՆՆԵՑՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է ԱՏՖազային ակտիվությունը հավերի գլխուղեղի համոգենատում, միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում և վերնստվածքային հեղուկում նրանց

սաղմնային և վաղ հետսաղմնային զարգացման ընթացքում: Ցույց է տրվել, որ զարգացման տարբեր շրջաններում (15,20 օրական սաղմ և 5 օրական ճուտ) 1 մգ սպիտակուցի վրա հաշվված ԱՏՖազային բարձր ակտիվությամբ օժտված են ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաները, այնուհետև հոմոգենատը և վերնստվածքային հեղուկը: Միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում և հոմոգենատում ֆերմենտի ակտիվությունը զգալիորեն խթանվում է Mg^{2+} -ի և 2,4 - դինիտրոֆենոլի (ԴՆՖ), իսկ վերնստվածքային հեղուկում՝ Ca^{2+} -ի ներկայությամբ: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ հասակային տարբեր շրջաններում հավի սաղմի գլխուղեղի ինչպես հոմոգենատը, այնպես էլ ենթաբջջային տարբեր ֆրակցիաները օժտված են կատիոններով և ԴՆՖ-ով խթանվող ԱՏՖազային ոչ միանման ակտիվությամբ: Ուղեղի հյուսվածքի պատրաստուկների եռակի սառեցումը և հալեցումը տարբեր ազդեցություն են ունենում ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кирсенко О. В. Третья Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы. Ереван, 55, 1963.
2. Палладин А. В., Кирсенко О. В. Биохимия, 26, 385, 1961.
3. Северин С. Е., Мишукова Е. А., Авдалла М. О. Ткаль В. В. Вопросы мед. химии, 14, 205, 1968.
4. Симосян А. А. Автореф. канд. дисс. Ереван, 1966.
5. Abood L., Gerard R. Amer. J. Physiol., 168, 739, 1952.
6. Chance B., Conrad H. J. Biol. Chem., 234, 1568, 1959.
7. Cseh G., Hermann V., Zombori J. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 5, 3-4, 353, 1954.
9. Halland J. E., Etheredge E., Rosenberg M. D. Biophys. Acta, 233, 1, 137, 1971.
8. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
11. Mandel P., Borkowski T., Harth S., Mardell R. J. Neurochem., 8, 126, 1961.
12. Novikoff A. B., Hecht L., Podber E., Ryan J. J. Biol. Chem., 194, 1, 153, 1952.
13. Skou J. C. Biochim. Biophys. Acta, 23, 394, 1957.
14. Skou J. C. Biochim. Biophys. Acta, 42, 6, 1960.
15. Vignais P. V., Vignais P. U., Lehninger A. J. Biol. Chem., 239, 2002, 1964.