ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXIX, № 11, 1976

УДК 577.3:577.15.07

Р. Б. БАДАЛЯН, А. А. СИМОНЯН, А. П. АКОПЯН

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТРазы ПЕЧЕНИ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Выделенные препараты митохондриальной АТРазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов и годовалых кур обладают низкой субстратной специфичностью, однако в большей степени гидролизуют АТР. Эти препараты отличаются друг от друга также в отношении ингибирования п-ХМБ.

Нашими предыдущими исследованиями [1, 2] из печени годовалых кур выделены четыре, а 19—20-дневных куриных эмбрионов—три различные фракции митохондриальной АТРазы, отличающиеся друг от друга как общей, так и стимулирующей Mg^{2+}, Ca^{2+} и ДНФ активностью. Полученные белки митохондриальной АТРазы обладают различной термолабильностью и оптимумом pH действия. Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные белки митохондриальной АТРазы печени куриного эмбриона и годовалых птиц своими ферментативными и физико-химическими свойствами различаются между собой. В связи с этим представляет определенный интерес изучение субстратной специфичности выделенных препаратов митохондриальной АТРазы печени. Исследовалось также действие п-хлормеркурибензоата (п-ХМБ) на активность различных фракций митохондриальной АТРазы печени как взрослых кур, так и эмбрионов.

Материал и методика. Опыты проводились на 19—20-дневных эмбрионах и годовалых курах белой русской породы. В качестве субстрата, кроме аденозинтрифосфата (АТР), мы использовали также аденозиндифосфат (АДР), гуанозинтрифосфат (ГТР), уридинтрифосфат (УТР), цитидинтрифосфат (ЦТР) и пирофосфат натрия (PP). Методы выделения митохондрий печени, определения их чистоты и получения препаратов митохондриальной АТРазы приведены в наших предыдущих работах [1, 2]. Выделение препаратов митохондриальной АТРазы проводилось по несколько модифицированному методу Сельвина [3]. Для выделения отдельных фракций митохондриальной АТРазы линейный градиент трис-HCl буфера создавался по методу Петерсона и Хейслера [4]. Сбор фракций осуществлялся при помощи автоматического коллектора.

Определение активности препаратов АТРазы проводилось при 37°C в среде, содержащей $MgCl_2$—10 мМ (или 2,4-динитрофенол—0,0005 М), 0,2 мл полученного ферментативного препарата и 4 мг субстрата. Объем доводился до 2 мл 0,05 М трис-HCl буфером (pH 7,4). Для ингибирования активности АТРазы п-ХМБ добавлялся в количестве 12,5 мМ в пробу [5]. Время инкубации 1 час. Реакция останавливалась добавлением 6 мл 5%-ой охлажденной трихлоруксусной кислоты. Неорганический фосфат определялся по методу Лоури и Лопес [6], с некоторыми видоизменениями

[7]. Количественные изменения белка в препаратах устанавливались по методу Лоури и сотр. [8]. Данные обработаны статистически [9].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показали (табл. 1), что высокая активность в различных фракциях митохондриальной Mg^{2+} —АТРазы печени 19—20-дневных куриных эм-

Таблица 1

Субстратная специфичность препаратов митохондриальной АТРазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов (Р в мкатомах/мг белка. M±m)

Субстраты	Фракции		
	I	II	III
	Mg^{2+}-АТРаза		
АТР	10,66±0,28*	12,60±1,10	6,13±0,32
АДР	3,36±0,20	3,69±0,60	2,38±0,94
ГТР	3,26±0,23	0,60±0,10	1,19±0,48
УТР	7,50±0,10	6,70±0,29	3,20±0,01
ЦТР	3,61±0,37	3,56±0,10	4,30±0,21
РР	2,66±0,30	3,31±0,31	0,45±0,04
	ДНФ-АТРаза		
АТР	1,70±0,01	2,80±0,02	1,10±0,15
АДР	0,25±0,01	0,57±0,13	0,20±0,01
ГТР	3,24±0,27	2,79±0,17	1,45±0,20
УТР	3,40±0,22	3,08±0,16	3,48±0,29
ЦТР	2,50±0,03	2,71±0,10	1,79±0,13
РР	0,96±0,10	2,19±0,41	1,44±0,36

* В табл. 1 и 2 средние данные 4 опытов.

брионов наблюдается при добавлении АТР (количество расщепленного фосфата составляет 10,66; 12,60 и 6,13 мкатома/мг белка/час соответственно в I, II и III фракциях). Интенсивным действием фермент отличается и при добавлении УТР. Сравнительно невысокая активность АТРазы в препаратах проявляется в присутствии АДР, ГТР, ЦТР и РР. Как видно, в различных препаратах митохондриальной АТРазы печени 19—20-дневных эмбрионов активность фермента в зависимости от присутствия того или иного субстрата различна.

При изучении активности ДНФ-зависимой АТРазы в различных белковых фракциях печени 19—20-дневных эмбрионов выяснилось, что интенсивное действие фермента наблюдается в присутствии ГТР и УТР (табл. 1). В этих условиях активность АТРазы низкая при добавлении АДР и РР. Как в предыдущих, так и в этих опытах интенсивность активности фермента в различных фракциях печени не одинаковая. Относительно высокой активностью обладают выделенные I и II фракции, низкой—III фракция.

Субстратная специфичность различных препаратов митохондриальной Mg^{2+}-АТРазы печени изучалась также у годовалых кур. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что у кур Mg^{2+} -АТРаз-

ная активность во всех выделенных фракциях высокая в присутствии АТР, затем ГТР и УТР. Аналогичная картина наблюдается и в отношении субстратной специфичности ДНФ-зависимой АТРазы.

Таблица 2

Субстратная специфичность препаратов митохондриальной АТРазы печени кур (Р в мкатомах/мг белка. M±m)

Субстраты	Фракции			
	I	II	III	IV
		Mg^{2+}-АТРаза		
АТР	10,50±0,30	8,70±0,47	2,54±0,26	3,37±0,39
АДР	3,76±0,53	2,33±0,29	0,69±0,07	1,37±0,33
ГТР	8,72±0,40	5,90±0,90	1,38±0,13	1,00±0,18
ЦТР	4,61±0,26	2,81±0,17	1,07±0,21	1,90±0,44
УТР	6,20±0,43	3,40±0,25	1,63±0,34	1,47±0,56
РР	3,59±0,28	3,24±0,35	0,16±0,01	0,52±0,16
		ДНФ-АТРаза		
АТР	2,62±0,05	1,27±0,28	0,65±0,07	1,07±0,19
АДР	0,86±0,03	0,37±0,09	0,13±0,01	0,17±0,03
ГТР	2,87±0,21	1,31±0,38	0,62±0,21	1,61±0,21
ЦТР	1,27±0,27	0,98±0,23	0,22±0,10	0,50±0,02
УТР	2,19±0,07	1,48±0,27	0,92±0,38	1,68±0,42
РР	0,51±0,08	0,41±0,14	0,28±0,09	0,16±0,03

При сопоставлении полученных результатов можно заключить, что различные фракции митохондриальной как Mg^{2+}, так и ДНФ-зависимой АТРазы печени 19—20-дневных эмбрионов и годовалых кур отличаются друг от друга субстратной специфичностью. Высокая активность АТРазы проявляется в присутствии АТР, затем ГТР, УТР и ЦТР. Как в эмбриональном периоде, так и у взрослых кур она сравнительно невелика при добавлении пирофосфата натрия.

На основании проделанной работы мы нашли целесообразным исследовать степень ингибирования п-ХМБ активности АТРазы в различных белковых препаратах, выделенных из митохондрий печени 19—20-дневных эмбрионов и годовалых кур. Как показывают приведенные в табл. 3 данные, ингибирование АТРазной активности п-ХМБ в различных фракциях не одинаковое. Так, например, в пробах без добавления активатора в присутствии п-ХМБ, по сравнению с контролем, этот показатель в печени 19—20-дневных эмбрионов составляет 42,5; 47,2 и 6,5% в I, II и III фракциях соответственно. При добавлении Mg^{2+} он составляет 52,4; 68,0 и 86,8, а в присутствии ДНФ—48,8; 59,3 и 9,6 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о различной реакции АТРазы на присутствие п-ХМБ в зависимости от фракции.

В табл. 4 приведены результаты изучения влияния п-ХМБ на АТРазную активность в различных белковых препаратах печени годовалых кур. Как показывают эти данные, в I, II и IV фракциях, выделенных из митохондрий печени годовалых кур, в присутствии п-ХМБ активность фермента подавляется почти в одинаковой степени и составляет

Таблица 3

Влияние п-ХМБ на различные фракции митохондриальной АТРазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов (Р в мкатомах/3 мг белка/час. M±m)

Условия опыта	Фракции		
	I	II	III
Контроль (без добавления активаторов)	4,85±0,31*	3,65±0,11	2,00±0,01
п-ХМБ	2,79±0,20	1,91±0,44	1,87±0,29
Mg^{2+}	18,90±0,20	7,20±0,15	5,30±0,01
Mg^{2+} + п-ХМБ	9,00±0,02	2,30±0,01	0,70±0,07
ДНФ	4,10±0,06	2,72±0,67	1,04±0,30
ДНФ + п-ХМБ	2,10±0,02	1,10±0,01	0,94±0,15

* Число опытов — 4.

Таблица 4

Влияние п-ХМБ на различные фракции митохондриальной АТРазы печени годовалых кур (Р в мкатомах/3 мг белка/час. M±m)

Условия опыта	Фракции			
	I	II	III	IV
Контроль (без добавления активаторов)	2,25±0,10	1,64±0,17	1,26±0,17	1,47±0,20
п-ХМБ	0,70±0,14	0,41±0,05	0,76±0,15	0,56±0,07
Mg^{2+}	8,91±0,34	6,72±0,18	5,34±0,14	5,81±0,32
Mg^{2+} + п-ХМБ	4,17±0,46	3,74±0,33	3,51±0,30	3,15±0,33
ДНФ	3,40±0,09	2,61±0,35	2,08±0,37	2,11±0,29
ДНФ + п-ХМБ	1,56±0,26	1,19±0,26	0,97±0,25	0,85±0,15

Средние данные 6—7 опытов.

61,9—75,0% по сравнению с исходной. В этих же условиях в III фракции она в сравнительно меньшей степени подвергается влиянию п-ХМБ. Аналогичная закономерность наблюдается и в отношении Mg^{2+}-зависимой АТРазы. Действие п-ХМБ на ДНФ-зависимую АТРазу во всех четырех фракциях почти одинаковое.

На основании полученных результатов можно заключить, что выделенные нами препараты митохондриальной АТРазы как из печени 19—20-дневных куриных эмбрионов, так и печени годовалых птиц обладают низкой субстратной специфичностью, однако в большей степени гидролизуют АТР. Они, кроме АТР, гидролизуют также АДР, ГТР, УТР, ЦТР и РР. Полученные нами результаты совпадают с данными Третьякова [10] и Вилгарда [11]. Первым автором показана

низкая субстратная специфичность препаратов митохондриальной АТРазы печени крыс; аналогичные результаты получены Вилгардом и сотр. с изолированными фракциями гипофиза быка.

Полученные нами препараты митохондриальной АТРазы печени как в эмбриональном периоде развития, так и у годовалых кур отличаются друг от друга также в отношении ингибирования п-ХМБ. Изложенные в статье результаты опытов позволяют предположить, что выделенные белки митохондриальной АТРазы печени как эмбрионов, так и кур по своим ферментативным и химическим свойствам отличаются друг от друга.

Институт биохимии АН АрмССР Поступило 15.VI 1976 г.

Ռ. Բ. ԲԱԴԱԼՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ա. Պ. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

ՀԱՎԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԼ ԱՏՊազայի ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՕՆԹՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Հավի 19—20 օրական սաղմերի և հասուն թռչունների միտոքոնդրիաներից անջատված АТРազային պատրաստուկները օժտված են սուբստրատային ցածր առանձնահատկությամբ, սակայն հիմնականում հիդրոլիզում են ադենոզինեռֆոսֆատը (АТР)։ Բացի АТР-ից, տարբեր չափերով հիդրոլիզում են նաև ադենոզիներկֆոսֆատը (АДР), գուանոզինեռֆոսֆատը (ГТР), ուրիդինեռֆոսֆատը (УТР), ցիտիդինեռֆոսֆատը (ЦТР) և պիրոֆոսֆատ նատրիումը։ Անջատված պատրաստուկներն իրարից տարբերվում են նաև պարաքլորմերկուրիբենզոատի ներկայությամբ АТР-ազայի ակտիվության ճնշման տեսակետից։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Симонян А. А., Бадалян Р. Б.* Биологический журнал Армении, 27, 10, 8, 1974.
2. *Симонян А. А., Бадалян Р. Б.* Биологический журнал Армении, 28, 3, 30, 1975.
3. *Selwin M.* Biochem. J., 195, 279, 1967.
4. *Peterson T., Heisler Ch.* Biochem. biophys res. comm., 12, 492, 1963.
5. *Цильмер М. К.* Автореф. канд. дисс., Тарту, 1975.
6. *Lowry O. H., Lopez J. A.* J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
7. *Скулачев В. П.* Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
8. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
9. *Закутинский Д. И., Селиванова Л. И.* Биологическая оценка препаратов для профилактики и лечения лучевой болезни. М., 1970.
10. *Третьяков А. В.* Цитология, 14, 6, 739, 1972.
11. *Vilhardt H., Hope D.* Biochem. J., 143, 1, 181, 1974.