

Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазная АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМ МОЗГА  
КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Р. А. СТЕПАНЯН, А. А. СИМОНЯН, Л. И. АГАДЖАНОВ, Р. А. СИМОНЯН

Приводятся данные о Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазной активности в микросомах мозга кур в онтогенезе. Максимальная активность фермента обнаруживается в период вылупления цыпленка. В раннем постэмбриональном периоде и у половозрелых кур она значительно снижается.

*Ключевые слова:* Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФаза, K<sup>+</sup>-п-нитрофенилфосфатаза, эмбриогенез, онтогенез.

В последние годы появилось множество работ об участии Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазной системы в активном ионном транспорте плазматических мембран. Интерес к изучению АТФаз мозга связан с предположением о возможном участии Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазы в работе ионного насоса путем включения в энергетический механизм активного переноса ионов Na из нейронов против концентрационного градиента. Однако данные, касающиеся становления активности и механизма действия Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазы в нервной ткани при развитии животных, очень немногочисленны. Мы исследовали динамику активности Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазы в мембранных структурах микросом мозга кур в отдельные периоды онтогенетического развития, а также влияние ионных (дезоксихолат, додецилсульфат) и неионных (третон X-100) детергентов на ферментную активность.

*Материал и методика.* Опыты проводили на 15- и 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах породы леггорн. Ферментный препарат получали по методу Цилмера и Тарве [13]. Извлеченный на холоду мозг гомогенизировали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ имидазоль-НСl буфера (рН 6,8) и 0,2% дезоксихолата натрия. Гомогенат центрифугировали при 30000 g в течение 1 часа. Полученную надосадочную жидкость разводили в 6 раз охлажденной дистиллированной водой и затем центрифугировали при 100000 g в течение 1 часа. Осадок суспендировали в таком же растворе, но без дезоксихолата и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин для удаления более крупных частиц, обладающих низкой активностью Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазы. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного препарата. Все этапы выделения ферментного препарата проводили при 0—3°. Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФазную активность определяли в среде, содержащей 30 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4), 3—MgCl<sub>2</sub>, 3—АТФ-трис, 100—NaCl и 20 мМ KCl. В контрольные пробы добавляли 0,1 мМ уабаина. Смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин с момента добавления ферментного препарата. Реакцию приостанавливали добавлением 5%-ного охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты. Об активности фермента судили по нарастанию неорганического фосфата в реакционной смеси. Опре-

деление неорганического фосфата проводили по Лоури и Лопес [21] в нашей модификации [12].

$K^+$ -фосфатазную активность определяли в смеси (объем 1,5 мл), содержащей 30 мМ трис-НСI буфера (рН 7,4), 5— $MgCl_2$ , 5— $KCl$  и 3 мМ п-нитрофенилфосфат (п-НФФ)—триса. В контрольных пробах  $KCl$  не добавлялся. Время инкубации—10 мин при 37°. Реакцию приостанавливали добавлением 3,5 мл 0,2 М  $NaOH$ . Содержание образовавшегося п нитрофенола (п-НФ) измеряли на ФЭК-60 при 390 нм. Активность фермента выражали в нмолях п-нитрофенола. Полученные данные пересчитаны на мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [22].

Добавление детергентов производили из расчета: 0,5% раствора дезоксихолата (ДОХ) и додецилсульфата (ДДС), 0,4 мг тритона X-100 на 1—2 мг белка. Ферментные препараты преинкубировали в присутствии детергентов при 37° в течение 20 мин, после чего в них определяли активность  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы.

*Результаты и обсуждение.* Результаты проведенных опытов показали, что  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазная активность в мембранных структурах микросом мозга в течение эмбрионального развития кур постепенно возрастает, до вылупления цыпленка (рис. 1). При этом прирост активности фермента у 20-дневных эмбрионов по сравнению с 15-дневными составляет 42%. Однако в микросомах мозга 5-дневных цыплят и кур активность фермента значительно снижена (более чем в 5 раз). Дальнейшее понижение ее наблюдается в микросомах мозга половозрелых кур. Динамика становления активности  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы в основном совпадает с изменениями активности  $Mg^{2+}$ -,  $Ca^{2+}$ - или ДНФ-зависимых АТФаз митохондрий нервной ткани в онтогенезе кур [11], с той разницей, что высокая активность последних сохраняется также в раннем постэмбриональном периоде. Имеются данные, согласно которым в переднем отделе мозга эмбрионов кур на ранних стадиях развития  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазная активность низка, она значительно (в 6—7 раз) увеличивается со второй половины инкубации [19]. Как показывают наши и данные других авторов, изменения в активности фермента коррелируют с изменениями электрической активности мозга. В этом отношении аналогичные изменения в нервной ткани выводковых и птенцовых птиц находятся в соответствии со степенью их морфофункционального созревания к моменту вылупления. Аналогичные данные получены также на млекопитающих [14, 18]. В первый месяц жизни в мозге крыс активность  $Mg^{2+}$ -АТФазы увеличивается в 4 раза [18], а содержание белков за это время удваивается [14], активность  $Mg$ -зависимой, активируемой  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы обнаруживается на 16-й день эмбриогенеза, в это время фермент малоактивен, он быстро активируется к моменту рождения [15].

Мы изучали также влияние различных концентраций ферментного белка на активность  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы. Полученные результаты показали (рис. 2), что в условиях нашего эксперимента 0,12 мг белка в среде обеспечивает максимальную активность фермента. Увеличение его количества до 0,3 мг приводит лишь к незначительному и статистически недостоверному увеличению  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы.

В настоящее время для выделения и солюбилизации связанной с мембранами  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы широко используют детергенты. Резуль-

таты наших исследований (рис. 3) показали, что при добавлении дедецилсульфата активность  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазы в микросомах на всех этапах развития цыпленка заметно подавляется (на 50% у 15-дневных эмбри-

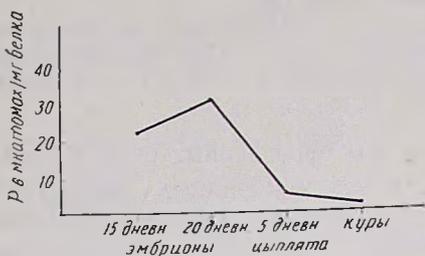


Рис. 1.

Рис. 1. Активность  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазы в мембранных структурах микросом мозга кур в онтогенезе.

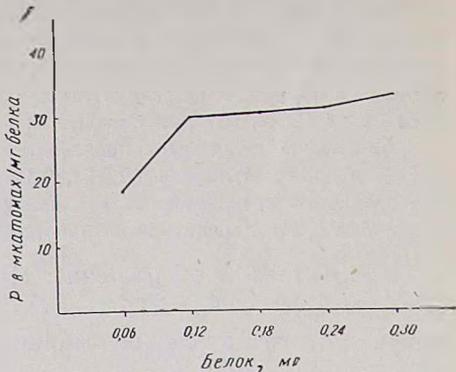
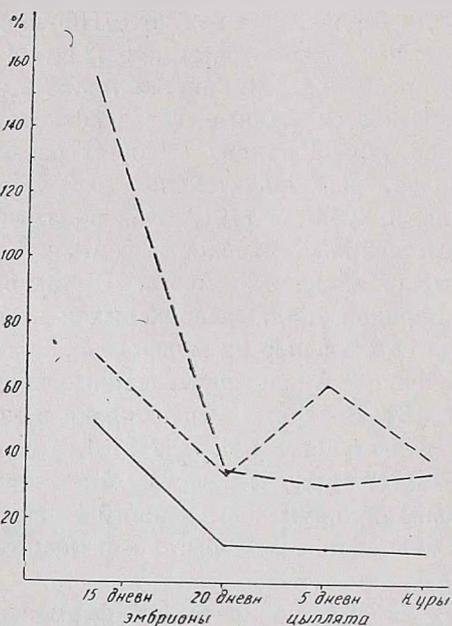


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние различных количеств ферментного белка на  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазную активность микросом 20-дневных куриных эмбрионов.



— DDC  
 --- DOK  
 - · - · - Тритон x-100

Рис. 3.

Рис. 3. Влияние детергентов на  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазную активность микросом мозга кур в онтогенезе (активность фермента в процентах по сравнению с контролем).

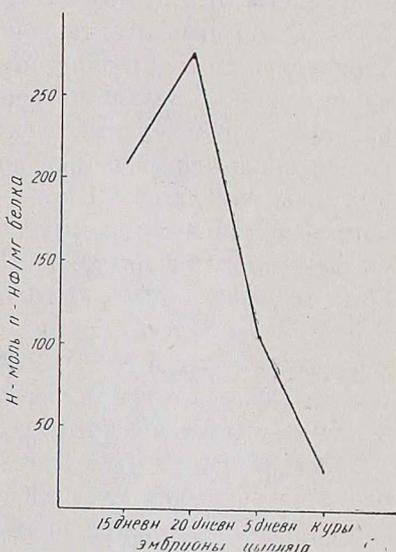


Рис. 4.

Рис. 4.  $\text{K}^+$ -p-НФФазная активность в микросомах мозга кур в онтогенезе.

онов по сравнению с контролем, а на последующих этапах развития и у половозрелых кур почти на 90%). Аналогичные, но менее наглядные результаты получены при добавлении дезоксихолата натрия. В присутствии тритона X-100 как в период вылупления цыпленка (20-й день), так и у 5-дневных цыплят и кур ферментная активность почти одинаково подавляется. При этом только у 15-дневных эмбрионов наблюдается 50-процентное повышение активности фермента по сравнению с контролем. В опытах Куллисаара и соавт. [9] в мембранных структурах микросом мозга кошек и крупного рогатого скота наблюдалось аналогичное подавление активности  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазы в присутствии детергентов. С другой стороны, по Кирсенко и Кравцову [6, 7], при сравнительно небольших концентрациях детергенты активируют  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазу в миелиновой, микросомальной и синаптосомальной фракциях. Однако в этих опытах был использован не осадок мембранных образований, а прозрачная надосадочная жидкость («растворимая» фракция), полученная после центрифугирования обработанной детергентами суспензии указанных органелл.

Характер действия детергентов во многом зависит от их концентраций [2, 3, 8]. Небольшие концентрации их активируют фермент, что обусловлено необратимым выявлением латентных активных центров фермента [16]; при этом целостность структуры мембран (белок—липидное соотношение) сохраняется [1, 4, 20, 23]. Большие концентрации подавляют  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазную активность [17]. В наших исследованиях указанные детергенты также неодинаково влияли на  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазу мембранных структур микросом мозга кур в онтогенезе. В отдельные дни развития цыпленка активность фермента больше подавляется в присутствии додецилсульфата. Интересно отметить, что по сравнению с другими периодами развития эмбриона на 15-й день угнетение активности фермента в присутствии детергентов менее выражено, а при добавлении тритона X-100 даже наблюдается активирование его.

Согласно современным представлениям,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазная реакция протекает поэтапно. За третий этап переноса ионов ответственна  $\text{K}^{+}$ -фосфатаза [5, 10]. Известно, что  $\text{K}^{+}$ -нитрофенилфосфатазная ( $\text{K}^{+}$ -п-НФФазная) активность отражает  $\text{K}^{+}$ -активируемую фосфорилирующую часть АТФазной реакции. Определение динамики активности  $\text{K}^{+}$ -фосфатазы в наших экспериментах показало, что у 15-дневных эмбрионов уровень ее довольно высок и продолжает возрастать до конца инкубации (у 20-дневных эмбрионов), а после выклева резко снижается (рис. 4). Аналогичная картина наблюдалась и при изменении активности  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазы (рис. 1).

На основании результатов проделанной работы можно заключить, что  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -АТФазная и  $\text{K}^{+}$ -п-НФФазная активность по ходу развития куриного эмбриона в мембранных структурах микросомальной фракции повышается. Наивысшая активность фермента отмечалась у 20-дневных эмбрионов. В постэмбриональном периоде она заметно снижается. Установлено, что анионоактивные детергенты—додецилсульфат и

дезоксихолат натрия и неионогенные детергенты—третон X-100 в определенных концентрациях и в отдельные периоды онтогенеза подавляют  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазу в мембранных структурах микросом ткани мозга кур.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 11.VII 1980 г.

$\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -ԱՏՖԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՈՒՂԵՂԻ  
ՄԻԿՐՈՍՈՄՆԵՐՈՒՄ ՕՆՏՈԳԵՆԵՑՈՒՄ

Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Լ. Ի. ԱՂԱԶԱՆՈՎ, Ռ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

$\text{Na}$ , $\text{K}$ -ԱՏՖազայի և  $\text{K}^+$ -նիտրոֆենիլֆոսֆատազայի ակտիվությունը ուղեղի միկրոսոմներից անջատված թաղանթային գոյացություններում հավի սաղմնային զարգացման ընթացքում աճում է: Նշված ֆերմենտների ամենաբարձր ակտիվություն դիտվում է 20 օրական սաղմերի մոտ: Վաղ հետսաղմնային շրջանում, 5 օրական ճտերի մոտ, ֆերմենտի ակտիվությունը նշանակալի չափով իջնում է: Հաստատվել է, որ որոշակի քանակով օգտագործված իոնային (դոդեցիլսուլֆատ և դեզօքսիլսուլատ) և ոչ իոնային(տրիտոն X-100) դետերգենտները տարբեր չափով ճնշում են  $\text{Na}$ , $\text{K}$ -ԱՏՖազային ակտիվությունը:

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase ACTIVITY OF HEN BRAIN MICROSOMES  
IN ONTOGENESIS

STEPANIAN R. A., SIMONIAN A. A., AGHAJANOV L. I., SIMONIAN R. A.

Data on the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-ase activity of hen brain microsomes in ontogenesis are given. Maximal activity of the enzyme is noticed after the chicken hatch. At early postembryonal period and in puberal hens the activity of the enzyme becomes significantly lower.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. Укр. биохим. ж., 43, 25, 1971.
2. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. Укр. биохим. ж., 44, 125, 1972.
3. Кирсенко О. В., Демченко П. А., Вавилова Г. Л., Ярошенко Н. А. Кравцова А. В. Укр. биохим. ж., 46, 300, 1974.
4. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. Молекул. биол. (Республ. межвед. сб.), 13, 44, 1976.
5. Комкова А. И. Биохимия, 39, 235, 1974.
6. Кравцов А. Л. Автореф. канд. дисс., Киев, 1974.
7. Кравцов А. В., Кирсенко О. В. Тез. докл. Всесоюз. симп. «Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки». 127, М., 1974.
8. Кравцов А. В. Укр. биохим. ж., 48, 769, 1976.
9. Куллисаар Т. Э., Тарее У. С., Тягелильд Л. Я. Мат-лы симп. «Регуляция ферментных систем». 60, Тарту, 1978.
10. Лишко В. К. Натриевый насос биологических мембран. 62, Киев, 1977.
11. Симонян А. А. Некоторые стороны энергетического обмена в онтогенезе кур. Ереван, 1970.
12. Симонян А. А. Докт. дисс., Ереван, 1973.

13. Цильмер М. К., Гуреев С. С. Укр. биохим. ж., 41, 456, 1975.
14. Bozkowa K., Lambert J. Prace i mater. nauk. Inst. matk. udziecka, 6, 17, 1965.
15. Cote L. J. Life Sci., 3, 899, 1964.
16. Jorgensen R. L., Skou J. C. Biochem. et Biophys. acta, 233, 366, 1971.
17. Rasin S. Biochim. et biophys. acta, 265, 241, 1972.
18. Samson F. E., Baltour W. M., Jacobs A. J. Amer. J. Physiol., 199, 693, 1960.
19. Štastny F. II Intern. Meet. Neurochem. Milano, 377, 1969.
20. Stahl W. L. Arch. Biochem. and Biophys., 154, 56, 1973.
21. Lowry O. H., Lopes J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
22. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
23. Wheeler K. P., Whittam R. J. Physiol., 207, 303, 1970.