УДК 577.15+577.3+591.39

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Р. А. СИМОНЯН, Л. А. АРУТЮНЯН, Н. О. МОВСЕСЯН, А. А. СИМОНЯН

Изучали изоферментный состав НАДФ- и НАД-зависимых изоцитратдегидрогеназ в цитоплазме и митохондриях мозга и печени кур в конце эмбриональной, начале постэмбриональной стадий развития и у зрелых птиц. Цитоплазматическая и митохондриальная НАДФ-изоцитратдегидрогеназы из обеих тканей куриных эмбрионов содержат по два изофермента, которые, претерпевая количественные изменения, прослеживаются в течение всего периода развития. Изоферментный спектр митохондриальной НАД-изоцитратдегидрогеназы в мозговой и печеночной тканях кур подвергается в онтогенезе более сложной и разнонаправленной перестройке. В митохондриях мозга кур появляется второй изофермент с высоким уровнем активности, в то время как в митохондриях печени исчезает анодный изофермент.

Ключевые слова: куры, изоцитратдегидрогеназа, изоферменты, онтогенез.

Множественные формы фермента—изоферменты, выработавшиеся в тканях в ходе длительной молекулярной эволюции, играют важную роль в метаболических процессах. Накопленный в последние годы обширный материал о физико-химических, иммунологических, электрофоретических свойствах различных изоферментов дал основание рассматривать их как проявление функциональной специализации ферментативных реакций. Специфичность функций изоферментов связана с особенностями их внутриклеточной локализации и проявляется в способности осуществлять тонкую регуляцию как интенсивности, так и направления обменных реакций.

Изоферментная природа ряда дегидрогеназ и их функциональная роль изучены достаточно полно, однако вопрос об изоферментах НАДФ- и НАД-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДФ-ИДГ и НАД-ИДГ) до настоящего времени остается открытым. Лишь в отдельных работах приводятся данные об изоферментах изоцитратдегидрогеназ, однако, полученные с помощью различных методов, они не могут дать четкого представления об их субклеточном распределении в тканях животных [2, 3, 5, 6, 8]. Кроме того, в доступной нам литературе мы не обнаружили сведений об изоферментах изоцитратдегидрогеназ в тканях птиц. Исходя из того, что изоферментная система подвергается изменениям в онтогенезе, мы предприняли опыты по изучению изоферментного состава НАДФ- и НАД-ИДГ в субклеточных фракциях мозга и печени кур в течение их эмбрионального и постэмбрионального развития.

Материал и методика. Исследования проводили на 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах. Гомогенаты печени и мозга готовили на 0,05 М трис-HCl буфере, pH 7,4, в отношении 1:3 и для солюбилизации изоцитратдегидрогеназ их инкубировали в течение 3 мин. при 0° с 0,1%-ным раствором тритона X-100. Затем пробы центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин и полученную надосадочную

жидкость использовали для электрофореза [2]. Митохондриальную и цитоплазматическую фракции печени и мозга получали по описанному ранее методу [1].

Разделение изоферментов изоцитратдегидрогеназ производили электрофорезом в полиакриламидном геле на приборе фирмы «Reanal» (модель 69). В качестве разделяющего геля использовали 7%-ный акриламид, составленный по прописи Эйткена и Брауна [4]; концентрирующим слоем служила суспензия сефадекса G-200 с рибофлавином. Катодный буфер—трис-глициновый, pH 8,6, содержащий 2 мМ изоцитрата; анодный—трис-буфер, pH 8,07 4. Сила тока 8 мА на гель, длительность разгонки—5—6 ч, метка—0,001%-ный раствор бромфенолового синего. По окончании электрофореза зоны локализации изоферментов изоцитратдегидрогеназ выявляли при помощи феназинметасульфат тетразолиевой реакции [4]. Количественную оценку активности отдельных изоферментов проводили путем измерения на денситометре интенсивности окраски зон их локализации. Активность изоферментных фракций выражали в условных единицах оптической плотности (пропорциональной площади окрашенных зон изоферментов) в пересчете на 1 мг белка в исследуемом образце, который определяли биуретовым методом [9].

Результаты и обсуждение. Полученные данные показывают (рис. 1), что цитоплазматическая и митохондриальная НАДФ-ИДГ в печеночной и мозговой тканях кур представлены двумя изоферментами. Оба изофермента НАДФ-ИДГ в цитоплазме печени эмбрионов имеют при-

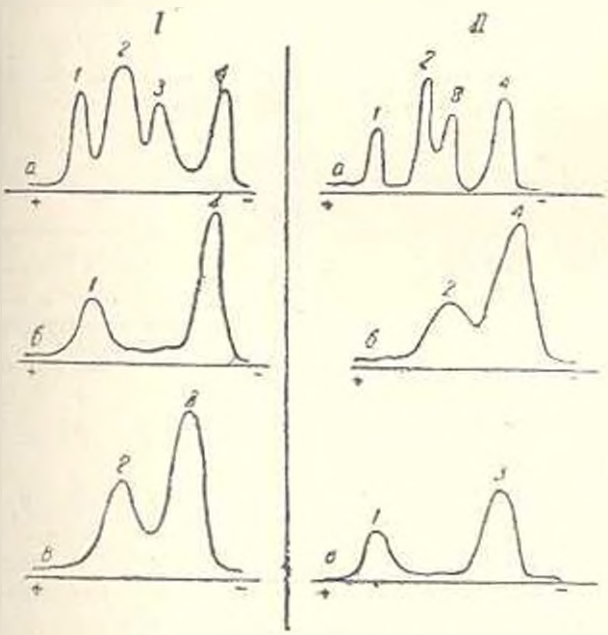

Рис. 1. Изоферментный спектр НАДФ-ИДГ в печени (I) и мозге (II) кур. Денситограммы. Гели окрашены на ферментативную активность. а—гомогенат; б—митохондрии; в—цитоплазма; 1—4—номера изоферментных фракций.

мерно равное содержание (табл. 1). В цитоплазме печени цыплят происходит повышение уровня анодного изофермента, с последующим его снижением у зрелых птиц; содержание катодного изофермента возрастает и превалирует в цитоплазме печени кур. В цитоплазме мозга эмбрионов (табл. 2) преобладает анодный изофермент; в ходе постэмбриогенеза его уровень снижается и повышается содержание катодного изофермента.

В митохондриях печени эмбрионов преобладает активность катодного изофермента НАДФ-ИДГ, доля которого с возрастом увеличивается. Следует отметить, что условная удельная активность обоих изоферментов митохондриальной НАДФ-ИДГ в печени эмбрионов значи-

Таблица 1

Изоферментный состав НАДФ-ИДГ в субклеточных фракциях печени кур в онтогенезе

Возраст	Цитоплазма			Митохондрии		
	условная удельная активность		% от общего содержания	условная удельная активность		% от общего содержания
	+	−		+	−	
20-дневные эмбрионы	0,045±0,004	0,053±0,002	45,9	54,1	0,109±0,008	0,164±0,012	39,9	60,1
5-дневные цыплята	0,074±0,006	0,047±0,005	61,2	38,8	0,060±0,104	0,141±0,014	29,9	70,1
Куры (5)	0,045±0,006 $p<0,025$	0,087±0,009 $p<0,025$ $p_1<0,025$	34,1	65,9	0,031±0,003 $p<0,01$ $p_1<0,001$	0,085±0,008 $p<0,025$ $p_1<0,005$	29,2	70,8

Примечание здесь и дальше + и − — анодный и катодный изоферменты, p — при сравнении с цыплятами, p_1 — с эмбрионами; в скобках — число опытов.

Таблица 2

Изоферментный спектр НАДФ-ИДГ в субклеточных фракциях мозга кур в онтогенезе

Возраст	Цитоплазма			Митохондрии		
	условная удельная активность		% от общего содержания	условная удельная активность		% от общего содержания
	+	−		+	−	
20-дневные эмбрионы	0,084±0,008	0,042±0,001	66,7	33,3	0,038±0,003	0,100±0,002	27,5	72,5
5-дневные эмбрионы	0,058±0,005	0,074±0,009	44,4	55,6	0,037±0,006	0,088±0,011	29,6	70,4
Куры (5)	0,068±0,001	0,095±0,002 $p>0,1$ $p_1<0,001$	41,7	58,3	0,080±0,002 $p<0,005$ $p_1<0,005$	0,095±0,004	15,7	84,3

тельно превышает таковую цитоплазматического фермента и последовательно снижается при постэмбриональном развитии, с сохранением процентного соотношения между изоферментами. В митохондриях мозга эмбрионов и цыплят отмечается сходное распределение изоферментов с преобладанием катодного изофермента; у кур происходит уравнивание содержания обоих изоферментов за счет повышения уровня анодного.

Как видно из приведенных данных, изоферментный спектр НАДФ-ИДГ в цитоплазме и митохондриях печени и мозга куриных эмбрионов

не изменяется до зрелого возраста и претерпевает лишь количественные сдвиги, сводящиеся к четкому преобладанию доли катодного изофермента в печени и к выравниванию соотношения между изоферментами в мозге.

Результаты исследования изоферментного состава НАД-ИДГ в тканях кур в онтогенезе приведены на рис. 2, табл. 3 и 4. Установлено,

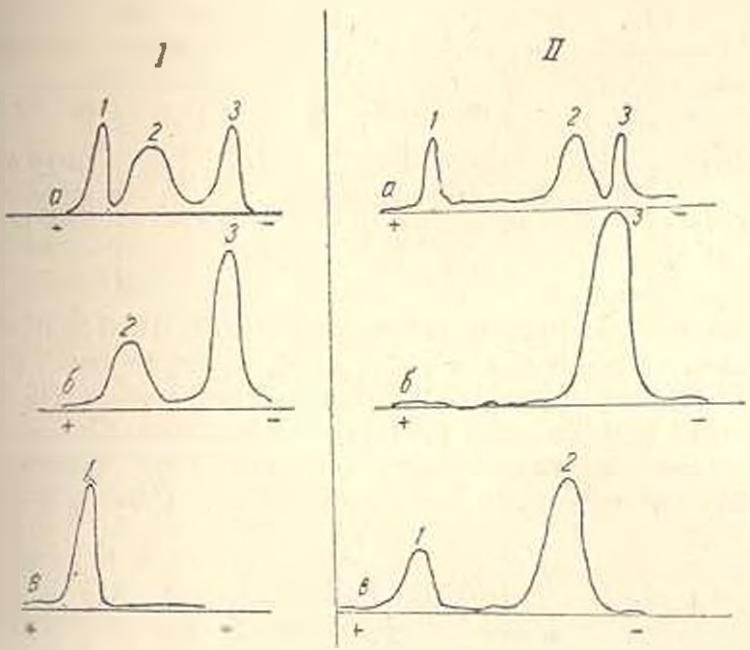

Рис. 2. Изоферментный спектр НАД-ИДГ в мозге (I) и печени (II) кур. Обозначения те же, что и на рис. 1.

что в митохондриях печени в конце эмбриогенеза фигурируют два изофермента НАД-ИДГ; в раннем постэмбриональном периоде уровень анодного изофермента снижается и исчезает у кур, у которых НАД-ИДГ представлена одним изоферментом. В митохондриях мозга наблю-

Таблица 3

Онтогенетические сдвиги в изоферментном составе НАД-ИДГ в печени кур

Возраст	Митохондрии				Цитоплазма			
	условная удельная активность		% от общего содержания		условная удельная активность		% от общего содержания	
	+	−			+	−		
20-дневные эмбрионы	0,180±0,012	0,111±0,005	61,9	38,1	0,033±0,003	0,060±0,005	35,5	64,5
5-дневные эмбрионы	0,111±0,005	0,120±0,005	48,1	51,9	0,041±0,007	0,077±0,006	34,7	65,3
Куры (5)	—	0,174±0,004 $p<0,001$ $p_1<0,001$			0,046±0,006	0,084±0,011	35,4	64,6

Таблица 4

Онтогенетические сдвиги в изоферментном составе НАД-ИДГ в мозге кур

Возраст	Митохондрии			Цитоплазма		
	условная удельная активность		% от общего содержания	условная удельная активность		% от общего содержания
	+	−		+	−	
20-дневные эмбрионы	—	0,088±0,001		—	0,078±0,004	
5-дневные цыплята	—	0,119±0,015		—	0,100±0,004	
Куры (5)	0,154±0,019	0,214±0,010 $p < 0.01$ $p_1 < 0.001$	41,8	58,2	—	0,139±0,007 $p < 0.01$ $p_1 < 0.005$

дается обратная картина: у эмбрионов и цыплят НАД-ИДГ представлена одним изоферментом, а у кур, наряду с повышением активности этого изофермента, обнаруживается появление второго. Несмотря на то, что НАД-ИДГ является преимущественно митохондриальным ферментом, нами обнаружены полосы активности этого фермента и при электрофорезе цитоплазмы печени и мозга кур в ходе развития.

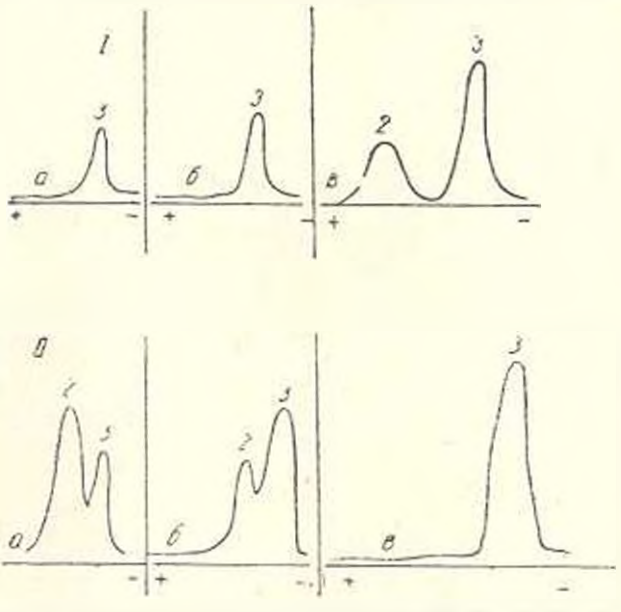

Рис. 3. Динамика изоферментного состава НАД-ИДГ в митохондриях мозга (I) и печени (II) кур в онтогенезе. а—эмбрионы; б—цыплята; в—куры.

Из приведенных на рис. 3 денситограмм видно, что изоферментная система НАД-ИДГ в митохондриях развивающихся тканей кур обнаруживает качественную и разнонаправленную перестройку. В митохондриях печени кур исчезает пик активности анодного изофермента, в то время как в митохондриях мозга в ходе его развития появляется новый изофермент с высоким уровнем активности.

Интерпретация литературных данных об изоферментах НАДФ-ИДГ различного происхождения довольно затруднительна, поскольку они получены разными методами. Отметим те работы, в которых был использован электрофорез в полиакриламидном геле. В гомогенатах печени крыс было обнаружено четыре пика активности фермента, которые одни авторы связывают с цитоплазмой и митохондриями [3], а другие частично приписывают их ядерной фракции [2]. Из данных Громека и Пастузко следует [8], что изоферментный спектр цитоплазматической и митохондриальной НАДФ-ИДГ, выделенных из мозговой ткани крыс, содержит две полосы активности, которые в митохондриях связаны с их наружной и внутренней мембранами. Полученные нами денситограммы распределения изоферментов НАДФ-ИДГ (рис. 1) показывают наличие четырех пиков активности в гомогенатах печени и мозга кур. Цитоплазматическая и митохондриальная НАДФ-ИДГ из этих тканей при наших условиях разделения представлены двумя изоферментами, которые прослеживаются с конца эмбриональной стадии развития кур и претерпевают количественные изменения активности в ходе онтогенеза.

В отношении изоферментов НАД-ИДГ можно сослаться лишь на исследования Покровского и Коровникова [3], обнаруживших, что НАД-ИДГ из печени крыс содержит три изофермента, локализация которых преимущественно связывается с митохондриями и ядрами. В наших опытах НАД-ИДГ в гомогенатах печени и мозга кур также представлена тремя изоферментами, два из которых в мозге выявлены в митохондриях, а в печени—в цитоплазме (рис. 2). Обнаружение активности НАД-ИДГ в цитоплазме печени и мозга кур мы склонны связать с фактом довольно заметного протекания в этой фракции указанных тканей кур реакции карбоксилирования α-кетоглутарата. Исходя из способности изоферментов регулировать также и направление ферментативных реакций, можно объяснить наличие изоферментов НАД-ИДГ в цитоплазме тканей кур их участием в обратной реакции.

Изучение изоферментов имеет большое значение для понимания молекулярных основ морфогенеза, поскольку известно, что синтез различных изоферментов запрограммирован генетически и коррелирует со стадиями развития организма. В этом аспекте онтогенетические сдвиги в изоферментном составе НАД-ИДГ могут быть следствием изменений на уровне транскрипции и трансляции отдельных изоферментов. С другой стороны, не исключено, что в ходе тканевой дифференцировки НАД-ИДГ проявляет неодинаковую способность к агрегации субъединиц. В пользу такого предположения говорят данные о том, что в зависимости от условий происходит сдвиг в мономерно-димерном равновесии НАД-ИДГ [7, 10]. Следует также отметить, что изменения в изоферментном составе НАД-ИДГ могут быть связаны со специфическим взаимодействием с низкомолекулярными лигандами или с другими белками. В этом случае исчезновение или появление новых пиков может быть результатом комплексования одной формы фермента с каким-либо белком, уровень которого меняется в ходе индивидуального развития.

Известно, что изоферменты дегидрогеназ обнаруживают специфическую реакцию на различные изменения физиологического состояния организма. В отношении изоцитратдегидрогеназ показано, что стрессовая реакция, вызванная голоданием, приводит к уменьшению активности обеих изоцитратдегидрогеназ в печени крыс, более выраженному в отношении изоферментов НАДФ-ИДГ, что, по-видимому, отражает более глубокое угнетение восстановительного синтеза по сравнению с окислительными процессами [3]. Изменение активности изоцитратдегидрогеназ в печени может происходить избирательно, за счет изоферментов, имеющих различную внутриклеточную локализацию. Так, введение крысам in vivo витамина А активирует митохондриальную НАДФ-ИДГ в печени, не влияя на цитоплазматический фермент. Так как обе формы НАДФ-ИДГ находятся под независимым генетическим контролем, полагают, что ретинол является специфическим индуктором митохондриальной формы фермента [2]. Наконец, специфическую реакцию проявляют изоферменты изоцитратдегидрогеназ при экспериментальных воздействиях на животных разного возраста: ишемия вызывает повышение активности НАДФ-ИДГ в митохондриях мозга новорожденных крыс, между тем как у взрослых животных она приводит к снижению энзиматической активности, особенно в наружных мембранах митохондрий [8]. Вышеизложенное говорит в пользу функциональной неравнозначности изоферментов изоцитратдегидрогеназ и свидетельствует также о том, что возрастная эволюция изоферментного набора различных тканей и его специфические изменения при различных функциональных состояниях направлены на более строгое регулирование особенностей метаболических процессов.

Следует полагать, что изменения в изоферментном спектре НАД-ИДГ, обнаруженные в наших опытах, связаны с ролью этого фермента в регуляции продуцирования энергии соответственно нуждам развивающихся тканей. Этот вывод косвенно подтверждается данными о повышении в митохондриях мозга в определенных условиях активности даже НАДФ-ИДГ—фермента, играющего вспомогательную роль в энергетическом метаболизме мозга [8]. Разнонаправленная перестройка изоферментов митохондриальной НАД-ИДГ в мозге и печени кур обусловлена особенностями метаболизма изоцитрата в этих тканях. Возрастное усложнение изоферментного спектра НАД-ИДГ в митохондриях мозговой ткани обеспечивает преимущественное окисление субстрата в мозге по НАД-зависимому пути и отражает совершенствование регуляции функций организма в течение онтогенеза.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 13.VII 1983 г.

ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐԸ ՀԱՎԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ ՆԵՐԱԲՋՋԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐՈՒՄ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

Ռ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Լ. Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ն. Հ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Պոլիակրիլամիդային հելի վրա էլեկտրաֆորեզի եղանակով ուսումնասիրվել է ՆԱԴՖ և ՆԱԴ-կախված իզոցիտրատդեհիդրոգենազների իզոֆերմենտային կազմը ուղեղի և լյարդի բջջապլազմայում և միտոքոնդրիաներում՝ հավերի սաղմնային զարգացման վերջում և հետսաղմնային զարգացման սկզբում։ Ուսումնասիրություններն կատարվել են նաև սեռահասուն թռչունների հյուսվածքներում։ Պարզվել է, որ ուսումնասիրված հյուսվածքների ինչպես բջջապլազմայում, այնպես էլ միտոքոնդրիաներում պարունակվում են ՆԱԴՖ-իզոցիտրատդեհիդրոգենազայի երկու իզոֆերմենտներ։ Սաղմի զարգացման ընթացքում դիտվել են այդ իզոֆերմենտների պարունակության բանակական փոփոխություններ։ Հետաքրքիր փոփոխությունների է ենթարկվում նաև ՆԱԴ-իզոցիտրատդեհիդրոգենազայի իզոֆերմենտային կազմը։ Հավի հասակին զուգընթաց ուղեղի միտոքոնդրիաներում երևան է գալիս բարձր ակտիվությամբ օժտված երկրորդ իզոֆերմենտ։ Հասուն հավերի լյարդի միտոքոնդրիաներում անհետանում է անոդային իզոֆերմենտը։

ISOENZYMATIC SPECTRUM OF ISOCITRATE DEHYDROGENASES IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF HENS BRAIN AND LIVER IN ONTOGENESIS

R. A. SIMONIAN, L. A. HAROUTIUNIAN, N. O. MOVSESSIAN, A. A. SIMONIAN

The composition of NADP- and NAD-dependent isocitrate dehydrogenases isoenzymes of cytoplasm and mitochondria of hens brain and liver has been studied by polyacrylamide gel disc—electrophoresis during ontogenesis. The cytoplasmic and mitochondrial NADP—IDH from both tissues occur in the form of two isoenzymes, undergoing quantitative changes during development. The mitochondrial NAD—IDH of embryonic liver contains two isoenzymes; in the process of maturation the level of the anodic isoenzyme decreases and disappears in adult hens. The mitochondrial NAD—IDH of embryonic and chicken brain has one isoenzyme, increasing parallel to the age, while in mitochondria of the adult brain the second isoenzyme is detected with high level of activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Мовсесян Н. О.* Онтогенез. *14*, 213, 1983.
2. *Конь И. Я., Ширина Л. И.* Биохимия. *46*. 789, 1981.
3. *Покровский А. А., Коровников К. А.* В кн.: Проблемы медицинской химии. М., 5, 1973.
4. *Aitken D. M., Brown A. D.* Biochem. J., *130*, 645, 1972.
5. *Andres A., Satrustegui J., Machado A.* Biochem. J., *186*, 799, 1980.
6. *Bell J. L., Sarma D. N.* Enzymol. biol. et clin., *9*, 393, 1968.

7. *Giorgio N. A., Yip A. T., Fleming I., Plaut G. W. E.* J. Biol. Chem., *245*, 5469, 1970.
8. *Gromeck A., Pastuszko A.* J. Neurochem., *28*, 429, 1977.
9. *Itzhaki R. F., Gill D. M.* Analyt. biochem., *9*, 401, 1964.
10. *Shen W. C., Mauck J., Colman R. F.* J. Biol. Chem., *249*, 7942, 1974

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 1, 1984

УДК 577.1.577.15

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АРГИНАЗЫ СЕМЯДОЛЕЙ ГОРОХА

Лж. А. ВАРДАНЯН, М. А. ДАВТЯН

Исследованы некоторые кинетические свойства аргиназы семядолей гороха.

Показано, что фермент конкурентно ингибируется L-лизином ($K_i = 13{,}3 \times 10^{-3}$ М) в то время как L-орнитин, L-пролин и ГАМК никакого действия не оказывают. Тиоловые группы играют существенную роль в проявлении аргиназной активности. Молекулярный вес фермента равен 204000.

Ключевые слова: горох, аргиназа, кинетические свойства.

В настоящей работе приведены результаты изучения некоторых физико-химических свойств (K_i, молекулярный вес, ингибирующее влияние аминокислот и реагентов на тиоловые группы) частично очищенной аргиназы семядолей гороха. Следует отметить, что подобные исследования на растительных организмах весьма немногочисленны.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха Рамонский 77. Использовались семядоли на второй день прорастания. Гомогенизация проводилась в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Элведжема при 0—4° с кварцевым песком в дистиллированной воде. Аргиназная активность определялась методом Ратнера [20], с последующим определением мочевины по Арчибальду [8]. Очистка аргиназы осуществлялась по разработанному нами методу [5]. Константа ингибирования определялась графическим методом Диксона [6]. Количество L-аргинина составляло 10 и 50 мкмоль. В качестве ингибиторов аргиназы использовались L-лизин, L-орнитин, L-пролин, ГАМК в количестве 5—50 мкмоль на пробу. Молекулярный вес определялся методом гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200 на основании построенного элюционного графика белков с известными молекулярными весами (уреаза—480000, D-аминокислотная оксидаза—182000, гемоглобин—67000 и трипсин—23000).

Результаты и обсуждение. На первом этапе нами исследовалось влияние L-лизина, L-орнитина, L-пролина и ГАМК на активность частично очищенной аргиназы семядолей гороха.

Согласно литературным данным, специфическими ингибиторами аргиназы различных организмов являются лизин и орнитин. Однако в литературе имеются также данные об ингибирующем влиянии ГАМК и пролина на аргиназу печени и почек крысы, печени овцы, куриного эмбриона, инфузорий и опухолей молочной железы [1, 2, 7, 12—14].

Полученные нами данные (табл.) свидетельствуют о том, что из использованных специфических ингибиторов лишь лизин заметно по-