«Нейрохимия», т. 2, № 4, 1983

УДК 577. 15+577.3+591.39

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА NAD- И NADP-ЗАВИСИМЫХ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ В ТКАНИ МОЗГА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

АРУТЮНЯН Л. А., СИМОНЯН А. А., СИМОНЯН Р. А.

Ткань мозга, как и большинство тканей животных, содержит две изоцитратдегидрогенезы, отличающиеся по коферментной специфичности, конформационным и кинетическим характеристикам, особенностям локализации и функционирования в клетке. NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NAD-ИЦДГ; КФ 1. 1. 1. 41) локализуется исключительно в митохондриальной фракции; очищенный фермент из ткани мозга имеет М 260—310 кД[1]. NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИЦДГ; КФ 1. 1. 1. 42), обнаруженная как в цитоплазме, так и в митохондриях ткани мозга [2], существует в мономерной и димерной формах [3].

Неодинаковы функции изоцитратдегидрогеназ в клеточном метаболизме. NAD-ИЦДГ рассматривается как «истинный компонент» цикла Кребса; участие же митохондриальной NADP-ИЦДГ в энергетическом метаболизме, как полагают, опосредовано через NADP:NAD трансгидрогеназную реакцию (NADP:NAD-оксидоредуктаза, КФ 1. 6. 1. 1.) [4]. Основная функция цитоплазматической NADP-ИЦДГ связывается с генерированием NADPH, необходимого для различных биосинтетических процессов.

Функциональные различия двух форм изоцитратдегидрогеназ обусловливают интерес к сравнительному исследованию их активности для выявления сдвигов в соотношении окислительных и биосинтетических реакций в тканях животных в ходе онтогенеза. Имеющиеся в литературе данные относительно изоцитратдегидрогеназной реакции в ткани мозга касаются преимущественно млекопитающих и охватывают в основном постнатальный период их развития [2, 5, 6]. Нас интересовало сопоставление характера течения этой реакции в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития животных. Исходя из этого, была изучена динамика активности двух форм изоцитратдегидрогеназ в ткани мозга кур в ходе онтогенеза.

Опыты проводили на эмбрионах (10-дневных—предплодный период; 15-дневных—плодный период; 20-дневных—период вылупления),

5-дневных цыплятах (ранний постнатальный период) и зрелых курах.

Митохондриальные фракции головного мозга выделяли в 0,25 М растворе сахарозы. Промытые митохондрии разрушали добавлением 0,2%-ного тритона Х-100. Обработанную тритоном митохондриальную фракцию центрифугировали при 45 000 g в течение 1 ч для осаждения митохондриальных мембран. Цитоплазматическую фракцию получали часовым центрифугированием постмитохондриального супернатанта при 100 000 g для освобождения от микросомных частиц [5].

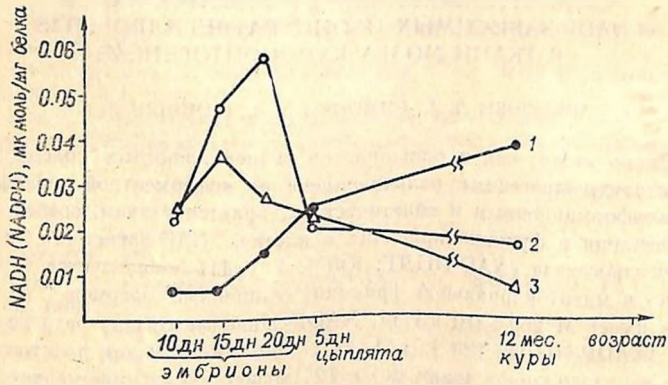

Рис. 1. Изменение активности NAD- и NADP-ИЦДГ в субфракциях мозга кур в онтогенезе (в мкмоль NADH (NADPH) /мг белка/мин). *1*—митохондриальная NAD-ИЦДГ; *2*—митохондриальная NADP-ИЦДГ; *3*—цитоплазматическая NADP-ИЦДГ

Определение активности NAD-ИЦДГ проводили в среде следующего состава (в мМ): трис-HCl—50 (pH 7,0), $MgSO_4$—10, ЭДТА—0,2. NAD добавляли в количестве 1,2 мМ, ADP и изоцитрат—по 2 мМ (конечные концентрации) [7]. Объем проб—2 мл.

Реакционная среда для определения активности NADP-ИЦДГ содержала (в мМ): трис-HCl—50 (pH 8,5), $MnCl_2$—2, ЭДТА—0,2. NADP добавляли в количестве 1 мМ, изоцитрат—2 мМ (конечные концентрации) [6]. Объем проб—2 мл.

Активность изоцитратдегидрогеназ определяли по образованию восстановленных форм коферментов при 340 нм на спектрофотометре марки «Specord UV Vis» и выражали в мкмоль NADH(NADPH)/мг белка/мин. Белок определяли биуретовым методом [8].

В отдельной серии опытов изучали влияние pH среды на активность изоцитратдегидрогеназ.

Результаты исследований показали (рис. 1), что активность NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга куриных эмбрионов начинает повышаться только со стадии вылупления и далее прогрессивно возрастает по мере созревания животных, составляя в мозгу зрелых кур более 60% от общей изоцитратдегидрогеназной активности. Активность NADP-ИЦДГ в

субфракциях мозга в эмбриональном периоде развития значительно превышает таковую NAD-ИЦДГ. В плодном периоде уровень обеих NADP-ИЦДГ в мозгу повышается, что особенно выражено в отношении митохондриального фермента, активность которого достигает максимальной величины на стадии вылупления. В раннем постнатальном периоде активность NADP-ИЦДГ в митохондриях резко падает и далее наблюдается постепенное снижение уровня обеих NADP-ИЦДГ в ткани мозга кур.

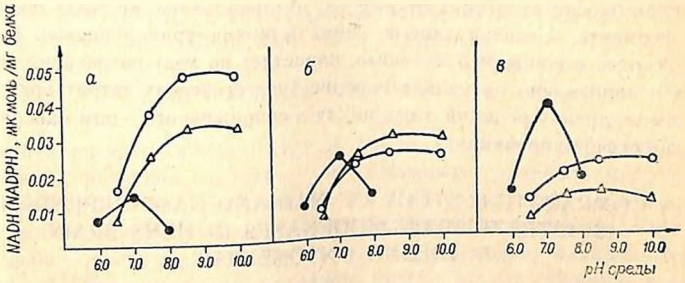

Рис. 2. Влияние pH среды на активность NAD- и NADP-ИЦДГ в ткани мозга кур в онтогенезе (в мкмоль NADH (NADPH) /мг белка/мин). *а*—20-дневные эмбрионы; *б*—5-дневные цыплята; *в*—куры. Обозначения те же, что и на рис. 1

Из приведенных на рис. 2 данных виден неодинаковый характер влияния pH среды на активность различных изоцитратдегидрогеназ. Для всех изученных возрастных групп обнаружена четкая зависимость активности NAD-ИЦДГ от pH инкубационной среды, с оптимумом при 7,0. По данным ряда авторов, эффект pH связан с воздействием на аллостерические свойства фермента [7]. Что касается NADP-ИЦДГ, то изменение ее активности наблюдается при повышении pH среды до 8,5 и проявляется заметнее в эмбриональной стадии развития.

Высокий уровень NADP-ИЦДГ в обеих фракциях мозга куриных эмбрионов свидетельствует о её активном участии в осуществлении связи между промежуточными продуктами цикла Кребса и аминокислотным и липидным метаболизмом, интенсивно протекающим в мозгу незрелых животных [9].

Представляет интерес динамика активности NAD-ИЦДГ в развивающемся мозгу кур. Ее повышение в митохондриях мозга совпадает с другими возрастными изменениями: образованием синапсов, синтезом миелина, появлением электрической активности, повышением Na^+, K^+-АТРазной активности. Эта морфологическая и физиологическая дифференциация взаимосвязаны с течением основного метаболизма и, в частности, с уровнем активности специфических энзиматических звеньев, контролирующих трикарбоновый цикл. NAD-ИЦДГ в митохондриях находится под аллостерическим контролем ADP, вызывающей кон-

формационные изменения фермента, повышающие его сродство к субстрату [10]. Снижение в митохондриях уровня ATP приводит к ускоренному прохождению изоцитрата через цикл и, следовательно, увеличению потока электронов через дыхательную цепь и поддержанию энергетического баланса клетки. Проведенное сравнительное исследование активности двух изоцитратдегидрогеназ в ткани мозга кур в онтогенезе показало превалирование активности NADP-зависимого фермента на эмбриональной стадии развития, что связано с его ролью в течении биосинтетических процессов; активирование же NAD-зависимого фермента, лимитирующего скорость цикла трикарбоновых кислот, происходит в конце эмбриогенеза, нарастает по ходу созревания животных и направлено на удовлетворение энергетических затрат организма путем ускорения реакций этого цикла и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования.

A COMPARATIVE STUDY OF NAD-AND NADP-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASES IN HENS BRAIN DURING ONTOGENESIS

HAROUTJUNIAN L. A., SIMONIAN A. A., SIMONIAN R. A.

The activities of NAD-and NADP-dependent isocitrate dehydrogeanses (NAD-IDH, NADP-IDH) were investigated in hen brain subcellular fractions during embryonal and postnatal development. It was shown that NAD-IDH activity in brain mitochondria rose during hatching and was maximal in mitochondria of adult brain. The activity of NADP-IDH in mitochondria and cytoplasm of embryonal brain is higher, than that of NAD-IDH, then it increased untill the period of hatching, especially in mitochondria with subsequent decrease in adult brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Willson V. J. C., Tipton K. F.* J. Neurochem., 33, 1239—1247, 1973.
2. *Loverde A. W., Lehrer G. H.* J. Neurochem., 20, 441—448, 1973.
3. *Dalziel K.* FEBS Lett., 117, suppl., 45—55, 1980.
4. *Stein A. M., Stein J. H., Kirkman S. K.* Biochemistry, 6, 1370—1379, 1967.
5. *Watanabe T., Goto H., Ogasawara N.* Biochem. Biophys. Acta, 358, 240—246, 1974.
6. *Прохорова М. И., Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д.* Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 9, с. 211—218, 1974.
7. *Willson V. J. C., Tipton K. F.* Eur. J. Biochem., 109, 411—416, 1980.
8. *Itzhaki R. F., Gill D. M.* Analyt. Biochem., 9, 401—410, 1964.
9. *Gonzalez-Ros J. M., Ribera A.* Lipids, 15, 279—284, 1980.
10. *Willson V. J. C., Tipton K. F.* J. Neurochem., 4, 793—799, 1980.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 3. II 1983