



УДК 577.15+577.3+591.39

АНИОНЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ АТРаза В СУБКЛЕТОЧНЫХ  
ОБРАЗОВАНИЯХ МОЗГА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

АСАТРЯН Р. М., БАДАЛЯН Р. Б., СИМОНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

К аниончувствительным АТРазам относят ферментные системы, осуществляющие гидролиз АТР, зависимый от анионов и, в первую очередь, от бикарбоната. Они широко распространены в бактериальных, растительных и животных организмах и играют важную роль в биоэнергетике клетки. Выдвинуто несколько гипотез для объяснения чувствительности к анионам АТР-гидролазной реакции, но единого мнения по этому вопросу пока не существует.

При изучении продуктов расщепления АТР в присутствии  $\text{HCO}_3^-$  было обнаружено незначительное образование АМР и преимущественный гидролиз до АДФ и  $\text{P}_i$  [1—4], что свидетельствует о том, что в этих условиях отщепляется только  $\gamma$ -фосфат.

Анионзависимые АТРазы различных клеточных структур находятся в мембраносвязанном и растворимом состоянии, сходны по субклеточному составу и обладают одинаковой чувствительностью к активаторам и ингибиторам [5].

Имеется очень мало сведений о локализации и свойствах анион-стимулируемых АТРаз в нервной ткани животных. Исследование фермента в структурных образованиях мозга выявило значительные различия во внутриклеточном распределении ее активности у крыс и обезьян [6].

Настоящая работа посвящена онтогенетическому изучению свойств  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -стимулируемых АТРаз в субклеточных структурах мозга кур. Исследовано также участие двухвалентных катионов в регуляции активности фермента в митохондриальной фракции мозга кур в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития.

Опыты проводили на 13-, 17-, 20-дневных эмбрионах, 1-, 5-дневных цыплятах и зрелых курах. Гомогенизацию ткани мозга проводили в гомогенизаторе типа Potter [7]. Митохондрии выделяли при 0—4° в 0,25 М сахарозе и 0,02 М трис-НСl буфере, рН 7,4. Ядерную фракцию осаждали при 800g 10 мин, а митохондрии—при 16000g 15 мин. Полученную митохондриальную фракцию промывали средой выделения. Для получения микросомной фракции надосадочную жидкость центрифугировали при

Таблица 1

Влияние  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$  на активность АТФазы в субклеточных образованиях мозга кур в онтогенезе.  $\Delta P$  в мкатамах/мг белка

| Субклеточные образования | Добавленный аннон  | 13-дневные эмбрионы     | Прирост активности в % | 17-дневные эмбрионы | Прирост активности в % | 20-дневные эмбрионы     | Прирост активности в % | 1-дневные цыплята       | Прирост активности в % | 5-дневные цыплята       | Прирост активности в % | Куры                   | Прирост активности в % |
|--------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Митохондрии              | контроль           | 2,43±0,06               |                        | 3,52±0,04           |                        | 4,28±0,08               |                        | 5,13±0,19               |                        | 5,81±0,17               |                        | 5,16±0,11              |                        |
|                          | $\text{HCO}_3^-$   | 3,81±0,04 <sup>3</sup>  | 56                     | 4,31±0,06*          | 22                     | 4,50±0,09               | 5                      | 5,55±0,07 <sup>3</sup>  | 8                      | 6,04±0,06               | 4                      | 5,66±0,10 <sup>4</sup> | 9                      |
|                          | $\text{SO}_3^{2-}$ | 3,98±0,07 <sup>2</sup>  | 63                     | 4,33±0,04           | 23                     | 4,75±0,12 <sup>3</sup>  | 10                     | 5,48±0,08               | 6                      | 5,87±0,05               | 2                      | 5,50±0,13              | 6                      |
| Мембраны митохондрий     | контроль           | 3,76±0,04               |                        | 4,95±0,13           |                        | 5,81±0,07               |                        | 6,01±0,18               |                        | 6,16±0,14               |                        | 5,73±0,08              |                        |
|                          | $\text{HCO}_3^-$   | 5,49±0,06 <sup>3</sup>  | 46                     | 5,53±0,09*          | 11                     | 6,62±0,08*              | 13                     | 7,17±0,18*              | 19                     | 6,56±0,07 <sup>3</sup>  | 6                      | 6,03±0,22              | 5                      |
|                          | $\text{SO}_3^{2-}$ | 5,36±0,08*              | 55                     | 5,53±0,08*          | 11                     | 6,30±0,11*              | 8                      | 6,73±0,18*              | 11                     | 6,16±0,10               | —                      | 5,85±0,17              | 2                      |
| Микросомы                | контроль           | 7,20±0,23               |                        | 8,09±0,27           |                        | 13,37±0,61              |                        | 18,75±0,27              |                        | 18,35±0,47              |                        | 12,74±0,33             |                        |
|                          | $\text{HCO}_3^-$   | 10,82±0,02 <sup>3</sup> | 50                     | 12,67±0,22*         | 56                     | 25,25±0,41*             | 45                     | 31,72±0,86 <sup>3</sup> | 69                     | 28,95±0,80 <sup>4</sup> | 57                     | 21,86±0,66*            | 71                     |
|                          | $\text{SO}_3^{2-}$ | 9,69±0,12*              | 34                     | 12,20±0,30*         | 50                     | 24,18±0,54 <sup>3</sup> | 39                     | 28,96±0,76 <sup>3</sup> | 54                     | 26,28±0,64 <sup>3</sup> | 43                     | 17,18±0,69*            | 34                     |

Примечание. Здесь и в табл. 2 количество опытов 4—12; \*статистически достоверные данные ( $p < 0.05—0.001$ ).

105000g 30 мин. Мембранные структуры митохондрий получали 3-кратным замораживанием-оттаиванием фракции с последующим центрифугированием при 105000g.

$\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -чувствительную АТРАЗную активность определяли в среде, содержащей 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ АТФ и 60 мМ  $\text{NaHCO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  [8]. Контрольные опыты вместо  $\text{NaHCO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  содержали соответственно 60 или 120 мМ  $\text{NaCl}$ . Активность фермента в присутствии двухвалентных катионов определяли, заменяя  $\text{MgCl}_2$  на хлориды соответствующих металлов в эквимольных количествах. Объем раствора доводили до 1 мл 0,25 М сахарозой трис- $\text{HCl}$  буфер, рН 7,4. Инкубацию проводили при 37° в течение 30 мин. Об активности АТРАЗы судили по изменению в среде содержания  $\text{P}_i$  [9], белок определяли по Lowry и соавт. [10].

Результаты наших экспериментов показали, что в изолированных митохондриях мозга активность  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы возрастает с 13 дня развития до вылупления цыпленка (табл. 1). Повышенная активность фермента отмечается и в митохондриях 5-дневных цыплят. Подобная динамика выявлена в митохондриальных мембранах и микросомной фракции. Характерно также, что в микросомной фракции выявляется наибольшая активность фермента в течение всего онтогенеза.

При исследовании стимуляции  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы бикарбонатом оказалось, что на 13-й день развития в интактных митохондриях мозга  $\text{HCO}_3^-$  повышает гидролиз АТФ на 56%. В ходе эмбрионального развития чувствительность к  $\text{HCO}_3^-$  снижается. Аналогичный сдвиг активности АТРАЗы наблюдается и в мембранах митохондрий. В микросомной фракции аниончувствительная АТРАЗная активность поддерживается на высоком уровне на протяжении всего эмбрионального периода и сохраняется после вылупления. Почти во всех исследованных сроках развития цыпленка активность  $\text{HCO}_3^-$  стимулируемой АТРАЗы в микросомах намного выше по сравнению с интактными митохондриями и их мембранными структурами. Чувствительность гидролиза АТФ к  $\text{SO}_3^{2-}$ , динамика ее изменений в основном такие же, как при активировании фермента  $\text{HCO}_3^-$ . Можно сделать предположение о важной физиологической роли аниончувствительной АТРАЗы митохондрий мозга на раннем этапе эмбрионального развития кур. В процессе развития, по-видимому, имеет место перераспределение активности фермента между отдельными структурными образованиями нервной клетки.

Известно, что для проявления активности аниончувствительной АТРАЗы необходимо присутствие двухвалентного катиона [11—15]. Имеющиеся данные указывают на то, что в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  расщепление АТФ происходит, как правило, примерно с одинаковой скоростью [16—19]. Но следует отметить, что скорость гидролиза АТФ при наличии этих катионов еще не определяет их эффективность в качестве агента, способствующего стимуляции АТРАЗной реакции анионами.

Представляет интерес изучение влияния двухвалентных катионов на  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -активируемую АТРАЗную активность при онтогенетическом развитии (табл. 2). Легко заметить, что различные катионы

Таблица 2

$\text{HCO}_3^-$ - и  $\text{SO}_3^{2-}$ -чувствительная АТРазная активность митохондрий мозга в присутствии двухвалентных катионов в онтогенезе кур.  $\Delta P$  в мкатомах/мг белка

| Условия опыта    | 13-дневные эмбрионы | Прирост активности в % | 20-дневные эмбрионы | Прирост активности в % | 5-дневные цыплята | Прирост активности в % | Куры | Прирост активности в % |
|------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------|------------------------|
| $\text{Mg}^{2+}$ | контроль            | 2,43±0,06              |                     | 4,28±0,03              |                   | 5,81±0,17              |      | 5,16±0,11              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 3,81±0,04*             | 56                  | 4,50±0,09              | 5                 | 6,04±0,06              | 4    | 5,66±0,10*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,98±0,07*             | 63                  | 4,75±0,12*             | 10                | 5,87±0,05              | 2    | 5,50±0,13              |
| $\text{Mn}^{2+}$ | контроль            | 2,58±0,10              |                     | 4,01±0,11              |                   | 4,87±0,07              |      | 5,13±0,25              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 3,61±0,07*             | 61                  | 4,76±0,16*             | 18                | 5,59±0,18*             | 14   | 6,29±0,08*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,13±0,11*             | 20                  | 4,50±0,17*             | 11                | 5,62±0,16*             | 15   | 5,47±0,10              |
| $\text{Ca}^{2+}$ | контроль            | 2,10±0,01              |                     | 3,45±0,13              |                   | 5,09±0,17              |      | 4,88±0,21              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 4,09±0,08*             | 94                  | 3,96±0,08*             | 15                | 6,70±0,16*             | 12   | 6,00±0,10*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,19±0,18              | 20                  | 3,47±0,10              | —                 | 4,95±0,20              | 2    | 5,03±0,22              |
| $\text{Zn}^{2+}$ | контроль            | 3,16±0,11              |                     | 3,17±0,07              |                   | 4,93±0,28              |      | 4,68±0,19              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 2,62±0,13*             | —                   | 2,60±0,14*             | —                 | 2,70±0,23*             | —    | 3,70±0,30*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,21±0,12              | —                   | 2,71±0,07*             | —                 | 4,30±0,14*             | —    | 4,44±0,24              |
| $\text{Co}^{2+}$ | контроль            | 2,82±0,26              |                     | 4,14±0,17              |                   | 5,42±0,12              |      | 5,75±0,03              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 3,46±0,15*             | 22                  | 4,64±0,15*             | 12                | 5,59±0,10              | —    | 6,69±0,04*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,92±0,02*             | 32                  | 4,18±0,06              | —                 | 6,69±0,13*             | 11   | 6,00±0,22              |
| $\text{Ni}^{2+}$ | контроль            | 1,71±0,06              |                     | 3,06±0,05              |                   | 4,43±0,17              |      | 3,84±0,10              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 1,99±0,05*             | 16                  | 2,91±0,17              | —                 | 2,65±0,20*             | —    | 3,30±0,19              |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 2,39±0,19*             | 39                  | 2,81±0,09*             | —                 | 3,89±0,16*             | —    | 4,30±0,22              |
| $\text{Cd}^{2+}$ | контроль            | 2,98±0,17              |                     | 2,95±0,07              |                   | 4,29±0,04              |      | 4,26±0,13              |
|                  | $\text{HCO}_3^-$    | 3,01±0,14              | —                   | 3,68±0,11*             | 24                | 4,73±0,04*             | 10   | 5,64±0,42*             |
|                  | $\text{SO}_3^{2-}$  | 3,13±0,14              | 5                   | 3,19±0,19              | —                 | 4,76±0,08*             | 9    | 4,94±0,31              |

оказывают неодинаковое действие на АТРазную активность в митохондриях мозга. Значительное активирующее влияние в мозгу 13-дневных эмбрионов отмечается в присутствии  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . У 20-дневных эмбрионов наибольший распад АТРа наблюдается в присутствии  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , а  $Cd^{2+}$  даже ингибирует гидролиз АТРа. При дальнейшем развитии активирующее действие отдельных катионов варьирует.

Высокая активность аниончувствительной АТРазы в присутствии некоторых катионов наблюдается в начале плодного периода эмбрионального развития кур: бикарбонат заметно стимулирует АТРазную активность. Присутствие  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  не влияет на интенсивность гидролиза АТРа в случае с  $Cd^{2+}$ , а с  $Zn^{2+}$  даже несколько подавляет ее. Стимулирование бикарбонатом АТРазы в присутствии различных катионов по ходу развития эмбриона заметно понижается. При этом сохраняется ингибирующее влияние  $HCO_3^-$  с  $Zn^{2+}$ , а в случае с  $Ni^{2+}$  активность фермента несколько повышается.

В изученные сроки по-разному действует присутствие двухвалентных катионов на  $SO_3^{2-}$ -стимулируемую активность. В митохондриях мозга на 13-й день развития  $SO_3^{2-}$  стимулирует активность фермента в присутствии  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ . В последующие сроки развития  $SO_3^{2-}$ -АТРазная активность заметно снижается, а в присутствии  $Cd^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  — полностью угнетается. Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковой эффективности различных двухвалентных катионов в АТРа-гидролазной реакции, осуществляемой аниончувствительными АТРазами.

## ANION-SENSITIVE ATPase IN THE SUBCELLULAR FRACTIONS OF HEN BRAIN IN ONTOGENESIS

ASATRIAN R. M., BADALIAN R. B., SIMONIAN A. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Armenian SSR, Yerevan

High activity of ATPase stimulated by  $HCO_3^-$  and  $SO_3^{2-}$  has been detected in mitochondria and their membranes at the beginning of the embryonic development of hen. During the following stages of development the intensity of the hydrolysis of ATP has been reduced. The high level of ATP has been reduced. The high level of ATP hydrolysis by anion-sensitive ATPase has been retained in microsomal fraction during the whole period of ontogenesis. Bivalent cations exert different effects on the anion-sensitive ATPase activity at various stages of hen development.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Fanestil D. D., Hastings A. B.* J. Biol. Chem., v. 238, p. 836—842, 1963.
2. *Liang C. T., Sactor B.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 176, p. 285—287, 1976.
3. *Ishida M., Mizushima S.* J. Biochem., v. 66, № 1, p. 33—43, 1969.
4. *Marunouchi T., Mori T.* J. Biochem., v. 62, № 4, p. 401—407, 1967.
5. *Иващенко А. Т.* Анноншие аденозинтрифосфатазы, Алма-Ата, Наука, 1982.
6. *Kimelberg H. K., Bourke R. S.* J. Neurochem., v. 20, № 2, p. 347—359, 1973.
7. *Potter V. R., Elvehjem C. A.* J. Biol. Chem., v. 114, № 2, p. 495—504, 1934.
8. *Иващенко А. Т.* Вест. АН КазССР, № 8, с. 73—75, 1977.
9. *Lowry O. H., Lopez J. S.* J. Biol. Chem., v. 162, p. 421—433, 1946.
10. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193 p. 265—275, 1951.
11. *Иващенко А. Т.* Биол. науки, № 1, с. 25—33, 1977.
12. *Иващенко А. Т.* Биохимия, т. 43, № 6, с. 1086—1089, 1978.
13. *Иващенко А. Т.* Изв. АН КазССР. Сер. биол. н., № 1, с. 22—25, 1979.
14. *Иващенко А. Т.* Биохимия, т. 45, № 3, с. 424—429, 1980.
15. *Скулачев В. П., Козлов И. А.* Протонные аденозинтрифосфатазы, М., Наука, 1977.
16. *Мальян А. П., Аққлова Е. А.* Биохимия, т. 43, № 7, с. 1206—1211, 1978.
17. *Morisawa M., Utida S.* Biochim. et biophys. acta, v. 445, № 2, p. 458—463, 1976.
18. *Rensis G. de, Bornancin M. A.* Biochim. et biophys. acta, v. 467, № 2, p. 192—207, 1976.
19. *Sachs G., Mitch W. E., Hirschowitz B.* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 119, № 4, p. 1023—1027, 1965.

Поступила 20. II 1985