

УДК 577.3:577.1

БИОХИМИЯ

Р. Б. Бадалян, А. А. Симонян, Р. А. Степанян

### АТФазная активность в субклеточных образованиях почек кур в онтогенезе

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 14/VI 1979)

Ряд важных вопросов, касающихся биохимии развития птичьего эмбриона, еще остается открытым. Мало изучен также механизм генерации и утилизации энергии в почечной ткани развивающегося организма. В связи с этим мы задались целью изучить изменения активности различных АТФаз в гомогенате и субклеточных образованиях почечной ткани кур в отдельные периоды их онтогенетического развития.

Опыты проводили на 15-, 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах белой русской породы. Возраст эмбрионов определяли по срокам инкубации яиц.

После декапитации цыплят на холоду извлекали почки, очищали их от связок и гомогенизировали (30 сек) тефлоновым гомогенизатором типа Поттера в среде 0,25 М сахарозы — 0,05 М трис-НСI буфера (рН 7,4) в соотношении 1:9. Ядра и цитоплазматические обломки осаждали при 800 g (10 мин), а митохондрии — 8000 g (15 мин). Супернатант использовали в опыте как надмитохондриальную жидкость. Осадок митохондрий промывали в среде выделения и вновь центрифугировали при 8000 g (15 мин). Морфологический контроль выявил гомогенность, целостность и подвижность выделенных митохондрий.

Определение активности АТФазы субклеточных образований почек проводили при 37° в среде, содержащей MgCl<sub>2</sub>—10, NaCl—100 + KCl—120, CaCl<sub>2</sub>—20 мМ, в конечной концентрации, 0,1 мл полученного препарата (соответствующего 1—2 мкг белка) и 2 мкг АТФ (Sigma Chem. Co.). Объем смеси — 1 мл, рН — 7,4, время инкубации — 30 мин. Активность АТФазы определяли по нарастанию неорганического фосфата в среде. Реакцию останавливали добавлением 3 мл 5%-ной охлажденной трихлоруксусной кислоты. Неорганический фосфат определяли образованием фосфомолибденового комплекса в присутствии восстановителя — аскорбата <sup>(1)</sup> и выражали в мкатамах/мг белка. Белок определяли по Лоури и сотр. <sup>(2)</sup>. В отдельных опытах применяли

п-хлормеркурибензоат (п-ХМБ), тритон X-100 и 2,4-динитрофенол (ДНФ). Тритон X-100 и п-ХМБ использовали по 0,9 и 4,7 мг соответственно в пробу, а ДНФ— $5 \cdot 10^{-5}$  М в конечной концентрации. Данные обрабатывали статистически (<sup>3</sup>).

Результаты проведенных исследований показывают (рис. 1), что в контрольных опытах (без добавления активаторов) АТФазная активность в изолированных митохондриях почечной ткани постепенно снижается в ходе эмбрионального развития кур. Так, например, на 15-ый день количество свободного фосфата, образовавшегося при расщеплении макроэргов, составляет 2,70, на 20-ый день—1,63, а у 5-дневных цыплят всего 1,38 мкатама/мг белка. Дальнейшее снижение ферментативной активности наблюдается в почках годовалых кур (1,04 мкатама Р).

При добавлении ионов Mg, Ca, а также ДНФ высокая активность фермента отмечается у 15-дневных эмбрионов (рис. 1, 2). По сравнению с 20-дневными эмбрионами у 5-дневных цыплят активность фермента несколько повышается, в дальнейшем снижаясь у годовалых кур.

Интересная картина в изменениях активности фермента в митохондриях в ходе развития наблюдается при использовании детергента—тритона X-100. При этом в опытах без добавления ионов статистически достоверное повышение активности фермента в присутствии тритона X-100 наблюдается в почках 5-дневных цыплят и годовалых кур. В этих условиях добавление ионов Mg приводит к снижению энзиматической активности у 15- и 20-дневных эмбрионов. Достоверное снижение энзиматической активности во все изученные сроки при добавлении тритона X-100 отмечается в присутствии ДНФ.

Как явствует из приведенных данных, при использовании тритона X-100 с добавлением различных активаторов динамика активности фермента в ходе эмбриогенеза не носит линейного характера и варьирует в отдельные периоды, характеризующие различные уровни структурной и функциональной зрелости почечной ткани.

При добавлении п-ХМБ активность фермента заметно подавляется во все периоды развития кур, однако в неодинаковой степени при использовании различных активаторов (рис. 1, 2). Значительное подавление энзиматической активности в присутствии п-ХМБ наблюдается в ранних периодах эмбрионального развития в митохондриях почек 15-дневных цыплят при добавлении ионов Mg, Mg+Na+K, Ca и ДНФ (количество свободного фосфата в 11; 5; 8 и 5 раз соответственно меньше по сравнению с контрольными опытами). У 20-дневных цыплят эти цифры значительно уменьшаются, доходя до минимального значения в митохондриях 5-дневных цыплят и годовалых кур.

АТФазную активность мы изучали также в гомогенате и надмитохондриальной жидкости. Результаты опытов (рис. 3, а) показывают, что по сравнению с митохондриями АТФазная активность в гомогенате отличается более низким уровнем во все периоды развития кур. Анало-

гичная картина в активности наблюдается также в надмитохондриальной жидкости (рис. 3, б). В гомогенате и надмитохондриальной жидкости более высокая активность АТФазы наблюдается на 15-ый день эмбрионального развития, заметно понижаясь на 20-ый день. Дальнейшее активирование фермента наблюдается у 5-дневных цыплят после вылупления. В присутствии ионов и ДНФ активность фермента в гомогенате почек и надмитохондриальной жидкости повышается неодинаково и варьирует в ходе эмбрионального и постэмбрионального периодов развития (рис. 3, а, б).

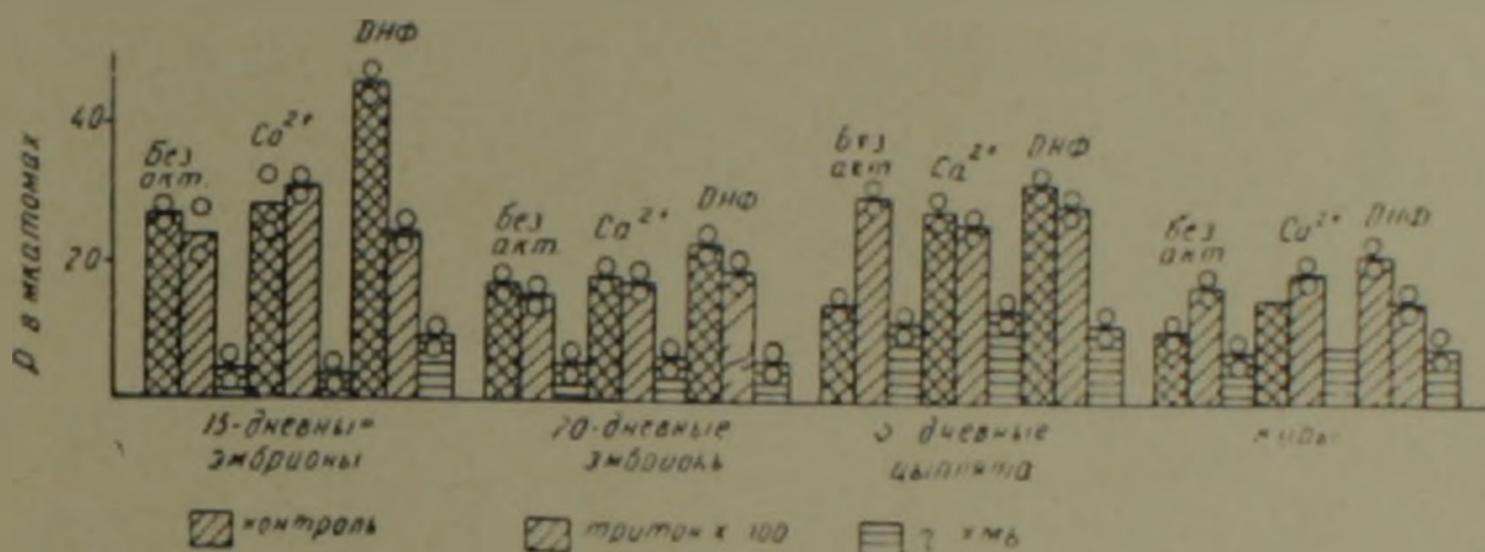


Рис. 1. Влияние тритона X-100 и п-ХМБ на активность  $\text{Ca}^{2+}$  и ДНФ активируемых АТФаз в митохондриях почек кур в онтогенезе

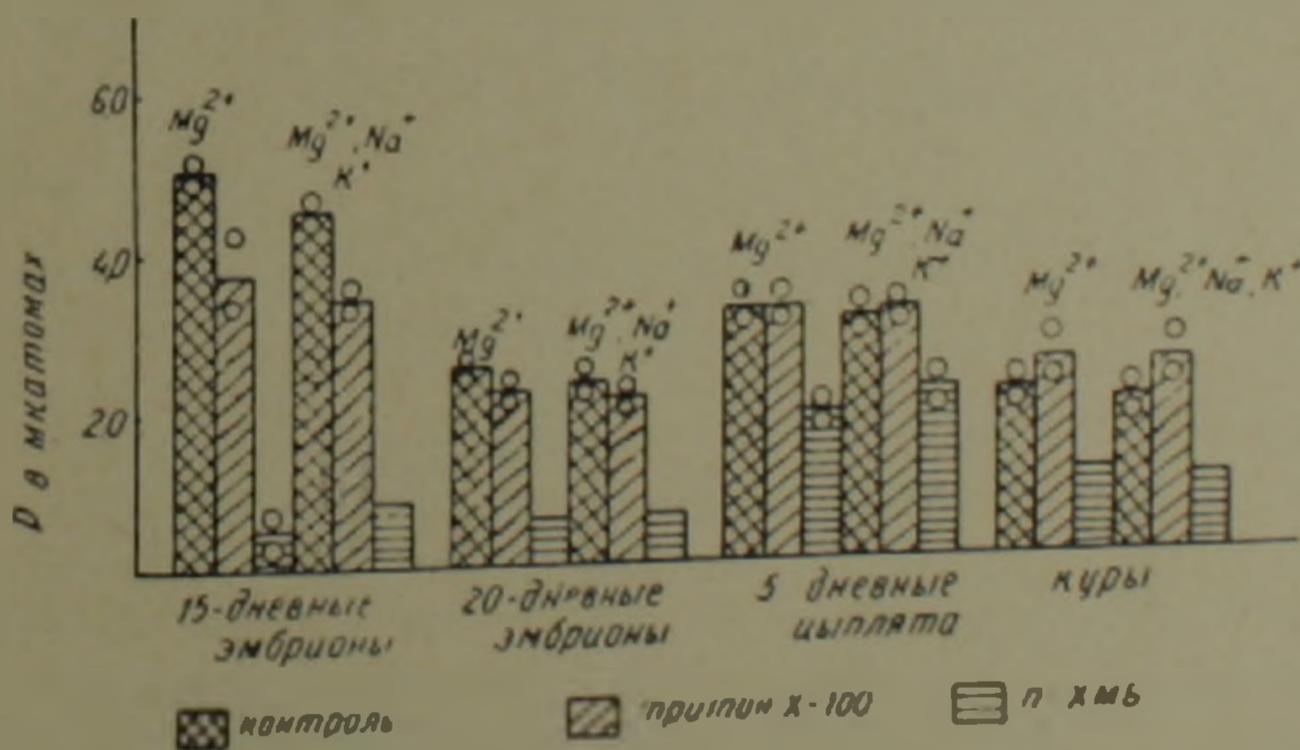


Рис. 2. Влияние тритона X-100 и п-ХМБ на  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$  активируемых АТФаз в митохондриях почек кур в онтогенезе

Мы изучали влияние термообработки на АТФазную активность митохондрий почек для выяснения термолабильности фермента в этих органеллах. С этой целью в течение 10 мин митохондрии инкубировали при 37, 45, 50, 60, 70 и 80°C. Дальнейшее инкубирование в течение 30 мин при 37° проводили непосредственно после добавления АТФ. Дан-

ные, приведенные на рис. 4, а, б, показывают, что как в эмбриональном, раннем постэмбриональном периодах, так и у годовалых кур угнетение энзиматической активности  $Mg^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -активируемых АТФаз отмечается еще при термообработке митохондрий при  $50^\circ$ . При  $60^\circ$  ферментная активность в митохондриях заметно подавляется; по сравнению с контролем  $Mg$ -АТФазная активность у 15-дневных эмбрионов понижается в 3, у 20-дневных эмбрионов и у кур—в 4 раза. В этих условиях еще большее угнетение отмечается в активности  $Ca^{2+}$ -активируемой АТФазы (в 12 и 5 раз у 15- и 20-дневных эмбрионов соответственно, в 6 раз — в митохондриях годовалых кур). При  $80^\circ$  активность фермента почти полностью подавляется.

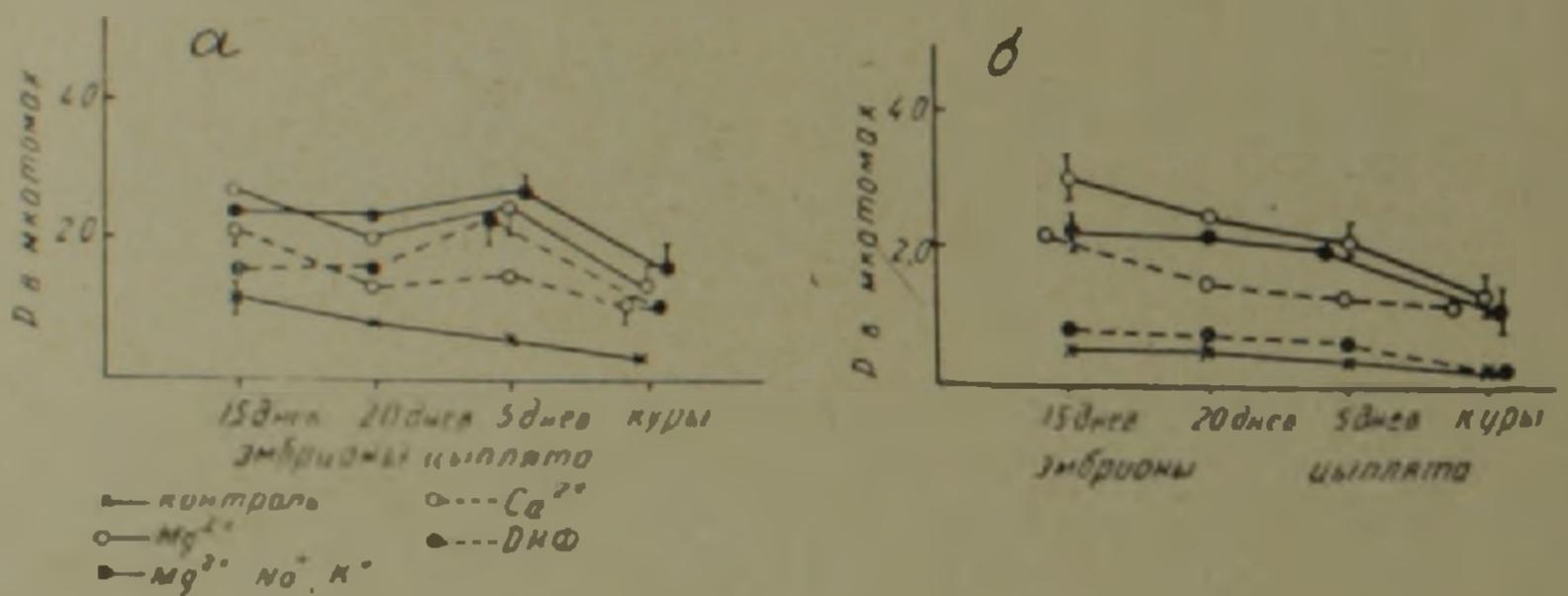


Рис. 3. Активность различных АТФаз в гомогенате (а) и надмитохондриальной жидкости (б) почек кур в онтогенезе

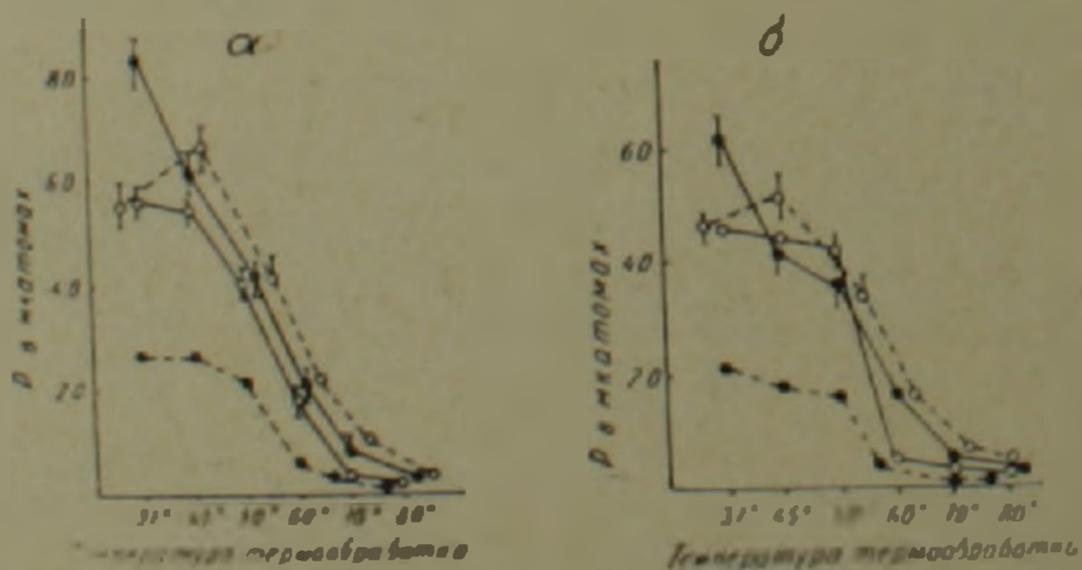


Рис. 4. Влияние термообработки митохондрий почек на активность  $Mg^{2+}$  (а) и  $Ca^{2+}$  (б) АТФаз

Сопоставляя полученные в этих экспериментах данные с результатами наших предыдущих исследований (4-6), можно заметить, что в митохондриальной фракции, выделенной из мозга и печени, АТФазная активность в ходе эмбриогенеза цыплят постепенно повышается, до-

ходя до максимума у 5-дневных цыплят. При изучении АТФазной реакции в изолированных митохондриях скелетных мышц нами была выявлена динамика активности фермента аналогичной почечной ткани. Известно, что одним из важных свойств актомиозинового белка мышечной ткани является АТФазная активность, обеспечивающая сократительную функцию и использование энергии АТФ при выполнении мышечной работы. Имеются данные (7) о наличии природного ингибитора митохондриальной АТФазы. Установлено, что этот митохондриальный ингибитор сильно угнетает Са-АТФазу актомиозина (8). Подавление АТФазной активности в наших опытах в конце эмбрионального и в раннем постэмбриональном периодах в почечной ткани кур, как и в мышцах, по-видимому, можно объяснить появлением и действием этого ингибитора в определенный период развития цыпленка. В этом отношении митохондрии мышц отличаются от мозга и печени. Какова физиологическая роль этого ингибитора в постэмбриональном периоде развития кур? Можно допустить, что этот ингибитор оказывает регулирующее действие при использовании энергии АТФ.

Институт биохимии  
Академии наук Армянской ССР

Ի. Բ. ԲԱՒԱԼՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ի. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

**ԱՏՖազային ակտիվությունը երկամների ենթաբջջային գոյացություններում հավերի օնտոգենեզում**

Ուսումնասիրվել է  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  և ԴՆՖ-խթանվող ԱՏՖազաների ակտիվության փոփոխությունները հավերի երկամներից մեկուսացված միտոքոնդրիաներում և վերմիտոքոնդրիալ հեղուկում հավերի օնտոգենետիկ զարգացման տարրեր շրջաններում (15, 20 օրական սազմ, 5 օրական ճուտ և հասուն հավ): Հետազոտվել է նաև տրիտոն X-100-ի և Ո-քլորմերկուրիբենզոատի ազդեցությունը նշված ԱՏՖազաների վրա: Ֆուլջ է տրվել, որ ինչպես նշված ակտիվատորների ներկայությամբ, այնպես էլ առանց դրանց, ԱՏՖազային ակտիվությունը բարձր է 15 օրական սազմերի երկամներից անջատված միտոքոնդրիաներում և վերմիտոքոնդրիալ հեղուկում: Զարգացմանը գույրնթաց 20 օրական սազմերի, ինչպիսի նաև 5 օրական ճտերի հյուսվածքում ֆերմենտի ակտիվությունն զգալիորեն իջնում է: Ծնթադրվում է, որ սազմնային զարգացման վերջում ԱՏՖազային ակտիվության ճնշումը կապված է հյուսվածքում բնական ինհիբիտորի առաջուցման հետ, որն, ըստ երևույթին, հանդիսանում է ԱՏՖ-ի էներգիայի օգտագործումը կարգավորող գործոն:

## ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> O. H. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., v. 162 (1946). <sup>2</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., v. 193 (1951).  
<sup>3</sup> Д. И. Закутинский, Л. И. Селиванова, Биологическая оценка препаратов для профилактики и лечения лучевой болезни, 97 (1960). <sup>4</sup> А. А. Симомян, Известия АН АрмССР (серия биол.), т. 18, 9 (1965). <sup>5</sup> Г. Х. Бунятян, А. А. Симомян, ДАН Арм. ССР, т. 41, № 2 (1965). <sup>6</sup> А. А. Симомян, Р. А. Степанян, Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, Ереван, т. 6 (1971). <sup>7</sup> J. H. Wang, Science, v. 167 (1970).  
<sup>8</sup> S. Yamazaki, H. Hasebe, H. Takisawa, Y. Tamaura, Y. Inada Biochem. biophys. Res. Commun., v. 75 (1977).