

П. В. ГУЛАК, Ю. П. КОЗЛОВ, И. М. ЛИМАРЕНКО,  
А. Г. ТРЕТЬЯК, Е. В. БУРЛАКОВА

# ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ АТФ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 15 VI 1972)

Уровень свободных радикальных (с.р.) процессов характеризует физиологическое состояние клеток и тканей. Так, было установлено, что при возникновении и распространении возбуждения по нерву имеют место химические процессы, в ходе которых образуются с.р. (<sup>1, 2</sup>). Была также показана зависимость уровня с.р. в нервном волокне от интенсивности протекающих в нем процессов (<sup>3, 4</sup>).

Целью данной работы является исследование радикалообразования при различных функциональных состояниях  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы нейролеммы. Для лучшего понимания явлений, наблюдаемых при исследовании транспортной АТФазы, была поставлена задача изучения общности явления радикалообразования при ферментативном гидролизе АТФ с участием ферментов различной природы.

Микросомальную фракцию седалищных нервов травяной лягушки получали по модифицированному методу Скоу (<sup>5</sup>); модификация заключалась в применении трис-буфера, pH 7,6. Саркоплазматический ретикулум,

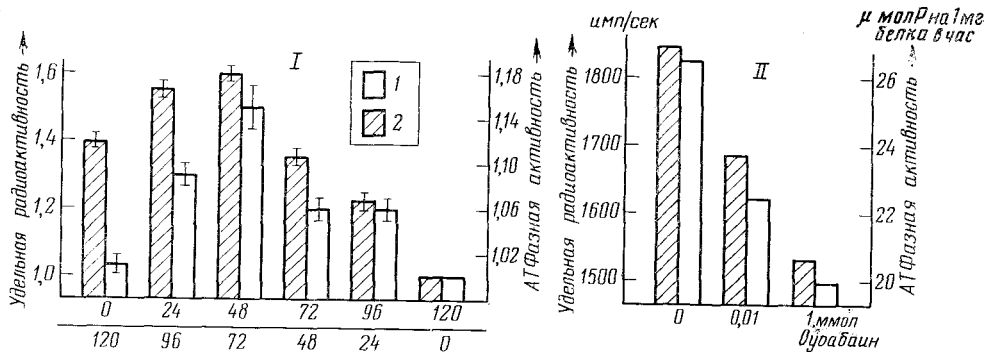


Рис. 1. Зависимость АТФазной активности и прививки  $\text{AA-C}^{14}$  в микросомах седалищных нервов лягушки от ионного состава среды инкубации (I) и от концентрации оуабайна в среде инкубации (II). I — АТФазная активность, 2 — удельная радиоактивность. Состав среды инкубации для I: микросомы 35–40  $\mu\text{г}$  белка на 1 мл; АТФ 2,5 мМ; гистидин 14 мМ;  $\text{MgCl}_2$  2,5 мМ ( $\text{NaCl} + \text{KCl}$ ) 120 мМ  $\text{AA-C}^{14}$  0,75  $\mu\text{С/мл}$ , pH 7,2,  $t = 20^\circ$ ; для II: микросомы 6  $\mu\text{г}$  белка на 1 мл, АТФ 2,5 мМ, трис- $\text{HCl}$  10 мМ,  $\text{MgCl}_2$  2,5 мМ,  $\text{NaCl}$  48 мМ,  $\text{KCl}$  72 мМ;  $\text{AA-C}^{14}$  0,75  $\mu\text{С/мл}$ , pH 7,2,  $t = 20^\circ$

обладающий  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активностью, получали по методу, описанному Ритовым (<sup>6</sup>). Миозин из мышц голубя получали по методу Бейли (<sup>7</sup>).

Концентрацию белка определяли по методу Люури (<sup>8</sup>). Концентрацию ортофосфата определяли по методу Уаль-Малерба и Грина (<sup>9</sup>). Регистрацию с.р. проводили методом привитой сополимеризации (<sup>10</sup>), для сополимеризации с полимерами ферментов использовали акриламид, меченный по углероду ( $\text{AA-C}^{14}$ ). Радиоактивность препаратов измеряли жидкостным сцинтилляционным методом на спектрометре АВАСЛ40 4К. Детектирова-

ние хемилюминесценции проводили с помощью стандартного фотоэлектронного умножителя ФЭУ-39.

Для определения в микросомах седалищных нервов лягушки АТФазы, ферментативная активность которой зависит от концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , а также для определения зависимости интенсивности включения  $\text{AA-C}^{14}$  в полимеры микросом от ферментативной активности мембранных АТФаз проведена серия экспериментов, в которых микросомы инкубировали в средах, различающихся по отношению концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при постоянстве суммарной концентрации одновалентных катионов.

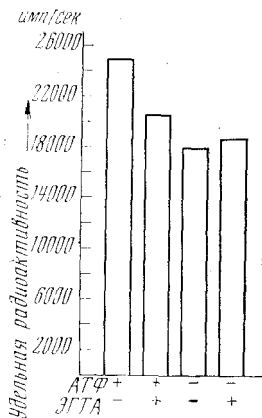


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость включения  $\text{AA-C}^{14}$  от ферментативной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Состав среды инкубации:  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза 0,2 мг белка на 1 мл, АТФ 0,5 мМ, имидазол 8 мМ,  $\text{NaCl}_2$  80 мМ,  $\text{MgCl}_2$  2 мМ,  $\text{AA-C}^{14}$  0,75  $\mu\text{C}/\text{мл}$ , pH 7,2;  $t = 25^\circ$

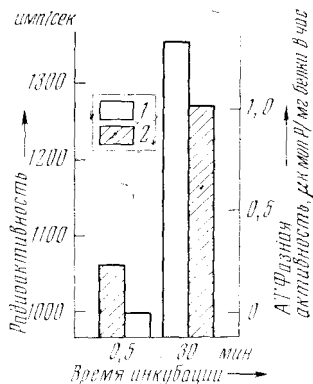


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость гидролиза АТФ и прививки  $\text{AA-C}^{14}$  в растворе мюзина от времени инкубации. Состав среды инкубации: мюзин 1 мг/мл, АТФ 0,5 мМ, трис- $\text{HCl}$  5 мМ,  $\text{CaCl}_2$  0,1 мМ,  $\text{KCl}$  0,3 мМ,  $\text{AA-C}^{14}$  0,75  $\mu\text{C}/\text{мл}$ , pH 7,6;  $t = 25^\circ$ . 1 — АТФазная активность, 2 — радиоактивность

Результаты измерений радиоактивности и АТФазной активности в пробах каждого эксперимента нормировали, соответствующие нормированные величины всех экспериментов обрабатывали статистически (доверительная вероятность выбранных нами доверительных пределов  $\alpha \approx 0,8$ ); полученные данные представлены на рис. 1, I.

Удельная радиоактивность в разных экспериментах была в пределах  $1 \cdot 10^{-2} \div 1 \cdot 10^{-1}$   $\mu\text{C}$  на 1 мг белка; АТФазная активность изменялась в пределах  $7,7 \div 50$   $\mu\text{мол}$ . Р<sub>неорг</sub> на 1 мг белка в час (в зависимости от препарата).

Из полученных данных следует, что увеличение АТФазной активности сопровождается увеличением включения метки. Экстремальная зависимость АТФазной активности микросом от соотношения концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  косвенно свидетельствует о наличии в них  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы.

Для прямого определения специфической  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной активности микросомальной фракции седалищных нервов лягушки в среду инкубации микросом с АТФ добавляли оуабайн; параллельно определяли сополимеризацию  $\text{AA-C}^{14}$ .

Результаты эксперимента представлены на рис. 1, II. Разница между АТФазной активностью в среде без оуабайна и АТФазной активностью в среде с 1 мМ оуабайном принята за специфическую  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазную активность и составляет  $\approx 25\%$  от общей АТФазной активности микросом.

Увеличение АТФазной активности сопровождается увеличением включения метки в полимеры микросом, как и в предыдущем случае.

Для определения общности явления радикалообразования при ферментативном гидролизе АТФ исследовали сополимеризацию АА-С<sup>14</sup> с биополимерами саркоплазматического ретикулула мышц кролика, а также с миозином из мышц голубя. Для подавления Са<sup>2+</sup>-АТФазной активности в среду инкубации саркоплазматического ретикулула добавляли ЭГТА — специфический комплексон ионов Са<sup>2+</sup>. Инкубацию проводили при 25°. Реакцию останавливали охлаждением до 0°. Результаты экспериментов представлены на рис. 2 и 3. Ферментативный гидролиз АТФ в обоих случаях сопровождался специфическим включением АА-С<sup>14</sup> в биополимеры ферментов, как и в случае каталитической активности Na<sup>+</sup> — K<sup>+</sup>-АТФазы.

На основании этих данных можно предположить общность явления радикалообразования при ферментативном гидролизе АТФ.

Косвенным подтверждением возникновения с.р. при ферментативном гидролизе АТФ является обнаруженная нами хемилюминесценция систем (Са<sup>2+</sup> — АТФазы + АТФ) и (миозин + АТФ). Состав сред инкубации отличался от указанных выше отсутствием АА-С<sup>14</sup>, а в случае Са<sup>2+</sup>-АТФазы — еще и присутствием 0,1 % тритона X-100.

Вполне возможно, что причиной возникновения возбужденных состояний молекул являются некоторые свободнорадикальные процессы, сопровождающие ферментативный гидролиз АТФ.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
15 VI 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Б. Н. Тарусов, ДАН, 167, № 4, 956 (1966). <sup>2</sup> О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко и др., ДАН, 172, № 5, 1200 (1967). <sup>3</sup> Ю. П. Козлов, О. Р. Кольс и др., Сборн. Физико-химические основы авторегуляции в клетках, М., 1968. <sup>4</sup> И. М. Лимаренко, С. П. Волкова и др., ДАН, 185, № 5, 1164 (1969). <sup>5</sup> J. C. Skeu, Biochim. et biophys. acta, 23, 394 (1957). <sup>6</sup> В. Б. Ритов, Биохимия, 36, № 2, 393 (1971). <sup>7</sup> K. Baily, Biochem. J., 36, 121 (1942). <sup>8</sup> Г. А. Кочетов, Практическое руководство по энзимологии, М., 1971. <sup>9</sup> Г. К. Саев, Изв. Центр. лаб. биохим. АН Болгарии, 1962. <sup>10</sup> Ю. П. Козлов, Привитая сополимеризация, как метод исследования свободных радикалов в биологических системах, М., 1970.