

УДК 577.152:547.963.2

Л. П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН, Г. К. ПАРСАДАНЯН, Г. Т. АДУНЦ, И. Г. АСЛАНЯН

О СВОЙСТВАХ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ ТКАНЕЙ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Определялись активность фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-азы) в печени, мозге, сердечной и скелетной мышцах, а также в желтке и желточном мешке развивающегося куриного эмбриона и чувствительность этого фермента к действию молочной кислоты, п-ХМБ, цистеина, глутатиона—SH и фтористого натрия. Наиболее резистентной к действию использованных агентов оказалась ФПФ-аза желточного мешка. Отмечена определяемая взаимозависимость в уровне активности ФПФ-азы и фосфоорилазы А в течение эмбриогенеза.

Возросший за последние годы интерес к изучению свойств фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-азы) (КФ 3. 1. 3. 16) объясняется выявлением широкого спектра деятельности этого фермента [8, 11, 15].

В то же время в литературе пока еще мало сведений о ФПФ-азе тканей эмбрионов [10, 12—14], что в особенности касается динамики активности ФПФ-азы и изменения ее свойств в ходе эмбриогенеза. Специфика эмбриогенеза состоит в «сопряженности» систем контроля, обеспечивающих гомеостаз клетки, с механизмами, связанными с процессами развития и дифференцировки зародышевых тканей. В процессе эмбрионального развития изменяется количество некоторых ферментов и как следствие—соотношение между ферментами различных функциональных групп [3].

Все сказанное вполне можно отнести и к ФПФ-азе—ферменту, тесно связанному как с утилизацией запасных фосфопротеинов (вителлинов) зародыша, так и с регуляцией деятельности целого ряда ферментов, осуществляемой путем их дефосфорилирования. Подобный полиморфизм ФПФ-азы может быть обусловлен либо изменением ее свойств по мере модификации ее функций в ходе эмбриогенеза, либо изменением соотношения между различными формами ее.

Ранее нами изучалась ФПФ-азная активность у белых крыс в ходе эмбриогенеза в норме и в присутствии некоторых SH-связывающих соединений [4]; изучалось также влияние аскорбиновой кислоты на активность ФПФ-азы в ходе развития куриного эмбриона [1]. В настоящей работе изучались динамика активности ФПФ-азы в желточном мешке и тканях куриного зародыша в ходе его развития, а также действие ряда агентов на активность этого фермента в течение эмбриогенеза.

Материал и методика. В качестве объекта исследования были использованы ткани куриного эмбриона (начиная с 12-го дня инкубации) и желточный мешок (с 8-го дня

инкубации). ФПФ-азу в пробах определяли по Файнштейну и Фольку [9]. В каждом опыте использовали 5—10 эмбрионов, в зависимости от их возраста. Гомогенаты тканей готовили на боратном буфере рН 6,2 в соотношении 1:10 (в/об). В качестве субстрата использовали 1% раствор казеина на том же буфере. Инкубацию гомогената проводили в течение 1 часа при рН 6,2 и температуре 37°. Инкубационная смесь состояла из 1 мл гомогената, 5 мл казеина и 1 мл испытуемого реагента. Результаты выражали в мкг неорганического Р, отщепившегося от казеина на 1 г сырого веса ткани.

Результаты и обсуждение. Данные о ФПФ-азной активности гомогенатов тканей и желточного мешка куриных зародышей в ходе инкубации приведены на рисунке. Как видно из рисунка, на 8—9-й дни инкубации в желточном мешке наблюдается довольно высокая ФПФ-азная активность, достигающая 600 мкг/г. В ходе инкубации она непрерывно снижается и к 15-му дню практически исчезает. В то же время в желтке с первого же дня инкубации эта активность полностью отсутствует. Сдвиги в активности ФПФ-азы в различных тканях зародыша носят индивидуальный характер и отражают различия в пуле ФП в ходе дифференцировки этих тканей.

Помимо динамики активности ФПФ-азы, изучалось также воздействие различных активаторов и ингибиторов на активность этого фермента в ходе развития зародыша. Выяснилось, что ФПФ-аза желточного мешка резко ингибируется NaF в концентрации 10^{-2} М и несколько слабее—в концентрации 10^{-3} М (табл.). Аналогичным образом влияет NaF и на ФПФ-азу сердца, скелетных мышц, мозга и печени, причем в печени она полностью ингибируется 10^{-2} М NaF, начиная с 16-го дня инкубации.

При изучении действия тиоловых соединений—SH-глутатиона и цистеина выяснилось следующее. Восстановленный глутатион в диапазоне концентраций 10^{-5} — 10^{-3} М в целом мало эффективен в отношении фермента желточного мешка, мозга, скелетных мышц и печени во все дни инкубации. ФПФ-аза сердечной мышцы несколько ингибируется 10^{-2} М SH-глутатионом; более низкие его концентрации практически неэффективны. Цистеин, взятый в субфизиологических концентрациях (10^{-4} — 10^{-5} М), слабо воздействует на активность ФПФ-азы в ходе эмбриогенеза. Можно лишь отметить, что на 15—16-й дни инкубации он повышает активность фермента во всех изучаемых органах, за исключением желточного мешка. Повторное повышение активности в присутствии цистеина наблюдается в сердце, печени и мозгу эмбрионов лишь на 21-й день. В мышцах цистеин с 16-го дня развития вызывает нарастающее ингибирование фермента (почти в 2 раза на 20-й день).

Во все рассмотренные дни инкубации п-ХМБ в концентрации 10^{-4} М— 10^{-3} М существенно подавлял активность фермента в большинстве тканей. Что же касается ФПФ-азы печени эмбриона, она проявляла наибольшую чувствительность к ингибитору на 15—16-й дни и к моменту вылупления.

Рассматривая данные о влиянии монофосфата (МФА), можно прийти к заключению, что и в этом случае ФПФ-аза желточного мешка

проявляет высокую резистентность. Довольно устойчива к воздействию МИА и ФПФ-аза печени и мозга зародышей. В концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} М МИА слегка снижает активность фермента в скелетных мышцах (за исключением 15-го и 19-го дней), а в более низких концентрациях (10^{-5} М) даже активизирует его на поздних этапах развития эмбриона (17—19-й дни). ФПФ-аза сердечной мышцы эмбриона также малочувствительна к МИА в концентрации 10^{-3} — 10^{-4} М, однако концентрация 10^{-5} М в большинстве случаев (в особенности на 16-й и 20-й дни) повышает ее активность.

Таблица
Влияние некоторых реагентов на активность ФПФ-азы тканей куриного эмбриона

Ткань	Желточный мешок			Сердце			Печень			Мышцы			Мозг		
	Концентрация NaF, М														
	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²
8	93	76	47												
9	100	70	50												
10	115	70	43												
11	109	70	50												
12	100	17	1				114	41	14				100	80	26
13	75	25	25				112	42	13				123	77	28
14	176	135	73	106	76	22	77	34	27	109	75	17	111	72	21
15	140	100	0	128	71	16	107	64	13	80	80	5	123	69	31
16	123	78	0	92	69	25	100	39	0	79	61	8	105	78	16
17	—	—	—	156	94	25	43	7	0	96	90	20	89	73	61
18	100	100	0	101	69	26	183	8	0	110	70	30	112	95	33
19	100	80	20	95	63	20	70	39	0	94	78	47	130	84	33
20	—	—	—	103	68	22	74	9	0	147	24	0	118	73	33
21	—	—	—	110	90	22	91	62	0	100	72	72	107	65	15
1-дневный цыпленок				96	46	0	80	5	0	72	31	0		54	22

Ткань	Желточный мешок			Сердце			Печень			Мышцы			Мозг		
	Концентрация п-ХМБ, М														
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
8	100	30	17												
9	70	4	4												
10	100	58	58												
11	78	41	41												
12	117	28	28				108	72	72				79	75	72
13	41	18	12				97	99	94				89	24	21
14	85	20	15	93	36	9	95	74	43	78	0	0	97	24	20
15	68	26	0	89	27	17	84	65	30	93	18	18	87	21	15
16	86	48	38	12	31	29	80	74	35	136	97	91	150	30	17
17	50	33	33	88	39	9	100	79	47	96	54	33	98	58	27
18	67	57	30	92	49	30	93	88	59	98	17	0	79	38	34
19	80	68	0	92	41	20	88	69	40	82	16	14	64	36	11
20	78	39	11	69	41	28	99	80	43	113	41	77	97	40	24
21	51	18	36	92	41	26	86	43	34	100	28		119	33	25
1-дневный цыпленок	20	27	69	91	35	9	86	83	90	22	21	72	96	26	

Дни инкубации	Концентрация МИА, М														
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
8	163	110	89												
9	109	87	94												
10	93	100	84												
11	102	107	89												
12	96	91	77				95	119	113				65	85	79
13	82	82	60				100	98	94				83	78	74
14	100	111	111	86	95	95	127	102	89	100	100	100	114	114	102
15	100	100	100	72	82	60	125	118	110	100	100	120	112	115	138
16	105	75	60	273	273	260	100	105	66	93	78	83	92	38	37
17	—	—	—	100	90	90	119	100	99	115	100	95	85	80	80
18	117	117	83	109	93	98	100	89	78	115	86	86	99	94	94
19	83	83	66	90	90	90	74	72	72	124	118	110	110	100	100
20	—	—	—	214	214	171	100	96	59	69	69	60	75	83	64
21	—	—	—	118	98	92	121	100	90	88	88	83	109	109	100

Примечание: Активность ФПФ-азы в контрольных опытах принята везде за 100%; активность в присутствии реагента выражена в % к контролю.

Отсутствие сколько-нибудь существенных сведений о сдвигах в активности и изменении свойств ФПФ-азы в ходе роста и дифференцировки зародышевых тканей не позволяет провести прямого сравнения полученных нами данных с литературными.

Из результатов наших исследований видно, что ФПФ-аза желточного мешка существенно отличается от таковой зародышевых тканей как по динамике активности, так и по свойствам. Так, после 9-го дня инкубации активность ее неуклонно понижается, полностью исчезая к концу инкубации. Цистеин, глутатион и МИА в концентрации 10^{-5} — 10^{-3} М мало влияют на активность фермента. Лишь п-ХМБ и несколько менее NaF в относительно высоких концентрациях (10^{-3} — 10^{-1} М) снижают активность этого фермента. Эти данные согласуются с данными Отаке [12], свидетельствующими об отличии ФПФ-азы желточного мешка от печеночной и мозговой. Определенное сходство наблюдается между ФПФ-азой желточного мешка кур и неоплодотворенной икры морского ежа, которая также не проявляет сдвигов в активности в присутствии SH-соединений [13]. Повышение ФПФ-азной активности в печени до максимума на 14—15-й дни инкубации связано, по-видимому, с повышенной потребностью в ФПФ-азе для регуляции интенсифицирующихся в этот период процессов углеводно-фосфорного обмена. Интересно, что снижение ФПФ-азной активности печени на 17-й день инкубации сопряжено с резким смещением соотношения фосфорилаза Б/фосфорилаза А в сторону повышения активности последней [2]. Увеличение активности ФПФ-азы в сердечной и скелетных мышцах на 16—17-й дни эмбриогенеза можно связать с тем, что эти дни вообще являются переломными в деятельности мышечной ткани и сопровождаются рядом функциональных и биохимических сдвигов. К этому времени завершается качественное формирование структуры мышечных волокон и в них накапливаются специфические сократительные белки, обеспечивающие мышечную де-

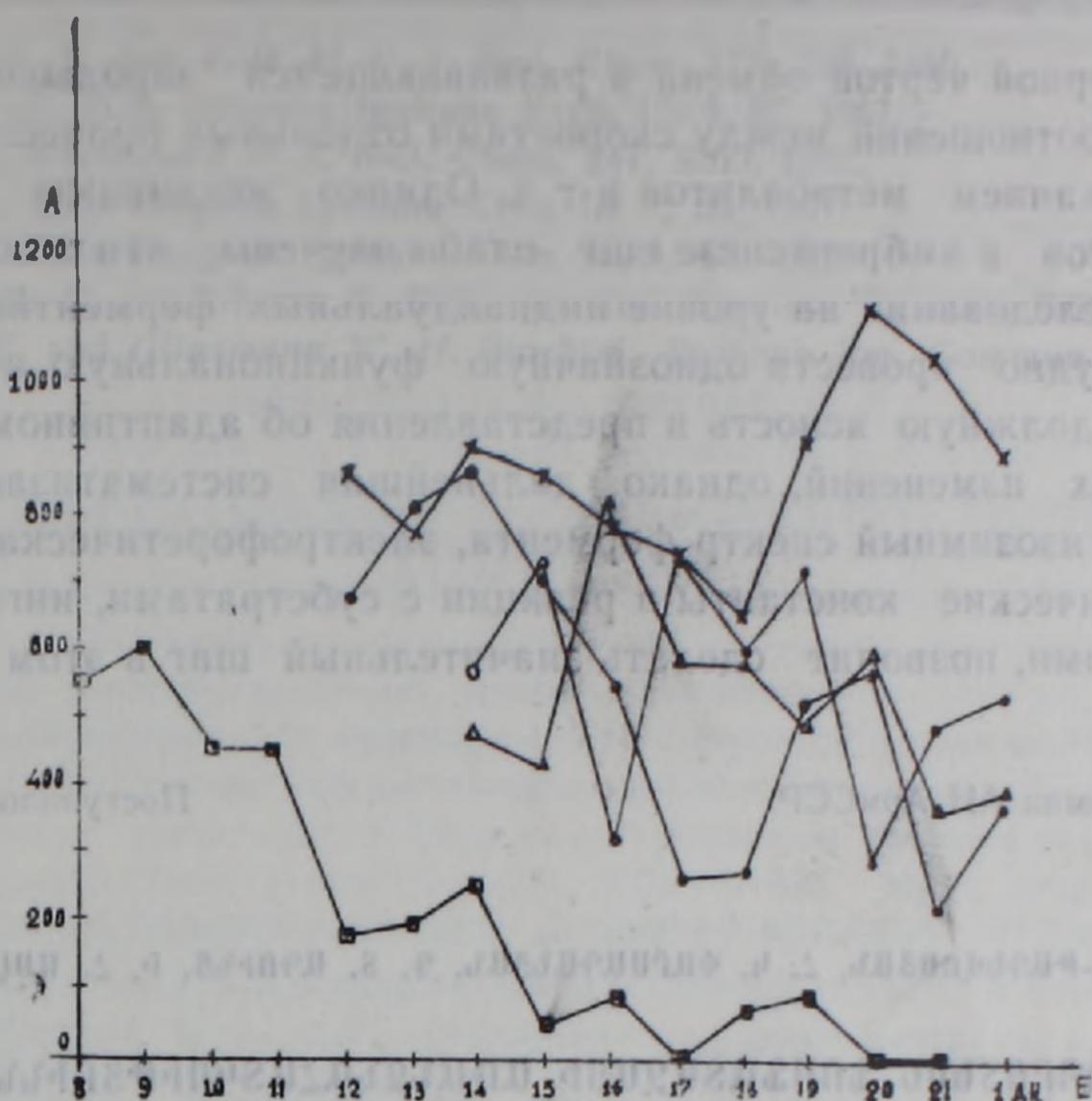


Рис. Активность фосфопротеинфосфатазы желточного мешка и тканей куриного эмбриона (в мкг неорг. Р/г сырого веса ткани/час). По вертикали—активность фермента, по горизонтали—дни инкубации (1 дн.—однодневный цыпленок) —□—□— желточный мешок, —●—●— печень, —×—×— мозг, —○—○— сердце, —△—△—скелетные мышцы.

тельность [6]. В эти дни интенсифицируется углеводно-фосфорный обмен мышечной ткани, о чем свидетельствует повышение содержания НАДФ, АТФ, КрФ и др. [5]. Повышение активности ФПФ-азы приводит к усиленному дефосфорилированию гликогенсинтетазы Д (активирование) и фосфорилазы А (ингибирование), что способствует переключению обменных процессов на накопление гликогена. Возможно поэтому максимальная активность ФПФ-азы мышц на 16-й день совпадает с незначительным уровнем фосфорилазы А, который повышается лишь с 18-го дня, когда уже наблюдается заметное падение ФПФ-азной активности [2, 7]. Высокая ФПФ-азная активность мозга эмбриона призвана, по-видимому, поставлять достаточное количество фосфата для синтеза специфических фосфолипидов и фосфатидов мозга. Свойства ФПФ-азы мозга изменяются в ходе эмбриогенеза. Так, на 16-й и 20-й дни инкубации отмечено максимальное подавление активности фермента 10^{-3}M МНА, на 16-й и 21-й дни— 10^{-3}M фтористым натрием, 10^{-3}M цистеина на 15-й день максимально повышает, а на 20—21-й дни снижает этот показатель. И, наконец, только на 16-й и 21-й дни инкубации п-ХМБ в концентрации 10^{-5}M не ингибирует ФПФ-азу. Такая специфическая чувствительность фермента к активаторам и ингибиторам на 15—16-й и 20—21-й дни эмбриогенеза может быть объяснена изменениями соотношения между отдельными его формами.

Характерной чертой обмена в развивающемся зародыше является изменение соотношений между скоростями отдельных процессов и реакций, содержанием метаболитов и т. д. Однако механизмы регуляции этих процессов в эмбриогенезе еще слабо изучены, что в особенности касается исследований на уровне индивидуальных ферментных белков. Хотя еще трудно провести однозначную функциональную интерпретацию, внести должную ясность в представления об адаптивном значении наблюдаемых изменений, однако дальнейшая систематизация таких данных, как изозимный спектр фермента, электрофоретическая подвижность, кинетические константы в реакции с субстратами, ингибиторами и активаторами, позволит сделать значительный шаг в этом направлении.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 14.V 1975 г.

Լ. Պ. ՏԵՐ-ԹԱԵՎՈՍՅԱՆ, Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Գ. Տ. ԱԳՈՒՆՅ, Ի. Հ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

ՖՈՍՖՈՊՐՈՏԵԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել է ֆոսֆոպրոտեին ֆոսֆատազայի ակտիվությունը զարգացող հավի սաղմի լյարդում, գանգուղեղում, սրտամկանում և կմախքային մկանում, ինչպես նաև՝ դեղնուցում, դեղնուցապարկում և այդ ֆերմենտի զգայունությունը մոնոյոդացետատի, պարաբլորմերկուրիբենզոատի, ցիստեինի, գլուտատիոնի և նատրիումի ֆտորիդի ազդեցությամբ՝ 10^{-5} — 10^{-2} խտության սահմաններում: Օգտագործված ազենտների նկատմամբ ամենամեծ կայունություն ցուցաբերել է դեղնուցապարկի ՖՊՖ-ազան: Նրա ակտիվությունը էմբրիոգենեզի ընթացքում իջել է, իսկ ֆոսֆոպրոտեին ֆոսֆատազայի ակտիվությունը դեղնուցում, ինկուբացիայի սկզբից, բացակայել է: Փորձ է արվել կապ հաստատել ֆոսֆոպրոտեին ֆոսֆատազայի հատկություններում տեղի ունեցած տեղաշարժերի և աճող սաղմի նյութափոխանակության մեջ տեղի ունեցող փոփոխությունների միջև:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т. и Симолян А. А. Известия АН АрмССР (биол. науки), 15, 9, 35, 1962.
2. Желудкова З. П. Сб. Ферменты в эволюции животных. Л., 103, 1969.
3. Мильман Л. С. и Юровицкий Ю. Г. Механизмы энзиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе. М., 1973.
4. Парсаданян Г. К. ДАН АрмССР, 51, 2, 121, 1970.
5. Перцева М. Н. Укр. биохим. журн., 35, 298, 1963.
6. Перцева М. Н. и Желудкова З. П. Сб. Ферменты в эволюции животных. Л., 77, 1969.
7. Bot G., Kovacs E. F., Andrassy R. O. Acta physiol. Acad. Sci. Hungar., 17, 383, 1960.
8. England P. I., Still I. T. and Krebs E. G. J. Biol. Chem., 247, 5275, 1972.

9. *Feinstein R. N. and Folk M. E.* J. Biol. Chem. 177, 339, 1949.
10. *Kanamori M.* Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 15, 1, 67, 1967.
11. *Maeno H., Greengard P.* J. Biol. Chem., 247, 3260, 1972.
12. *Ohtake M.* Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 15, 1, 33, 1967.
13. *Ohtake M.* Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 15, 1, 43, 1967.
14. *Rinaudo M. T. and Glunz C.* Boll. Soc. Ital. Sperim., 10, 1113, 1964.
15. *Zieve F. E. and Glinsmann W. H.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 50, 872, 1973