

It has been shown that ethanolamine increases the enzymatic activity and noradrenaline sensitivity in the liver of experimental rats.

The action of ethanolamine on the enzymatic sensitivity is clearly expressed in adrenal glands, but ethanolamine does not influence on the basal activity of the enzyme.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барсегян Г. В. Лаб. дело, 1, 20, 1966.
2. Вировец О. Л. Успехи совр. биологии, 65, 3, 384, 1968.
3. Гюльбазян Т. А., Ширинян Э. А., Камалян Р. Г. Биолог. ж. Армении, 28, 3, 103, 1975.
4. Джанноладян Е. Г. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1973.
5. Камалян Р. Г. Сб. научн. тр. Ер. зоовет ин-та, 45, Ереван, 1978.
6. Камалян Р. Г., Авагян Э. А., Арванов В. Л., Айрапетян С. Н. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 455, 1979.
7. Камалян Р. Г., Ширинян Э. А., Камалян Г. В. Биолог. ж. Армении, 27, 5, 31, 1974.
8. Ростомян М. А. В кн.: Циклические нуклеотиды. Тез. докл. Всесоюз. симпоз., 104, Киев, 1980.
9. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Архив анат., гистол., эмбриол., 76, 1, 56, 1979.
10. Boura A. L., Gree A. F. Ann. Rev. Pharmacol., 5, 183, 1965.
11. Duly J. Cyclic nucleotides in nervous system, N. Y. and London, Plenum Press, 1977.
12. Guislandi M. Brit. J. Clin. Pharm., 8, 3, 282, 1979.
13. Hechter O., Yoshnaga K., Halkerston D. K., Cohn C., Doad P. Molecular Basis of some Aspects of Mental Activity, 1, 291, 1966.
14. Iversen L. L. J. Neurochem., 29, 5, 1977.
15. Lefkowitz R. J., Williams L. T. Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 515, 1977.
16. Levitzki A., Helmreich E. J. M. FEBS letters, 101, 2, 213, 1979.
17. Mc Cune R. W., Gill Th. H., Hungen K., Roberts E. Life Sci., 10, 2, 443, 1971.
18. Sutherland E. M., Robison G. A. Pharmacol. Rev., 18, 145, 1966.
19. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 211, 927, 1954.
20. Weiss B., Costa E. Science, 155, 3783, 1750, 1977.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 10, 1983

УДК 577.15+577.3+591.39

АТРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПЕЧЕНОЧНОЙ ТКАНИ КУР В ОИТОГЕНЕЗЕ

Р. А. СТЕПАНЯН, А. А. СИМОНЯН

Исследовали влияние различных активаторов (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+}) и детергентов (тритон X-100 и дезоксихолат) на активность АТФазы плазматических мембран печени кур в онтогенезе. Максимальная активность Na^+ , K^+ -активируемой АТФазы обнаруживается в постэмбриональном периоде, у 5-дневных цыплят.

Ключевые слова: АТФаза, плазматические мембраны, куры, эмбриогенез.

В последние годы появилось множество работ об участии Na^+ , K^+ -АТФазной системы в активном ионном транспорте плазматических мембран. Ферментативная активность Na^+ , K^+ -АТФазы проявляется в гидролитическом расщеплении АТФ с образованием АДФ и ортофосфата. Реакция протекает в присутствии Mg^{2+} и активируется Na^+ и K^+ , которые эффективны только при совместном действии. В зависимости от активирования ионами АТФазная активность подразделяется на три группы: Mg^{2+} или Ca^{2+} -зависимые и Mg^{2+} , Na^+ -зависимая, убаивчивствительная. Получены многочисленные доказательства того, что эти ферменты являются составными частями плазматических мембран. Интерес к изучению АТФаз плазматических мембран связан с предположением о возможном участии Na^+ , K^+ -АТФазы в работе ионного насоса путем включения в энергетический механизм активного переноса ионов Na против концентрационного градиента. Накоплен большой экспериментальный материал относительно плазматических мембран тканей различных животных, однако соответствующая литература о птицах в онтогенезе нам не встречалась, поэтому мы нашли целесообразным исследовать изменение активности АТФаз печеночной ткани кур по мере развития в присутствии активаторов (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+}) и детергентов (третон X-100 и дезоксихолат). Этот вопрос заинтересовал нас и в связи с нашими предыдущими исследованиями, касающимися становления и развития АТФаз в некоторых субклеточных образованиях мозга при эмбриональном и постэмбриональном развитии птиц [3].

Материал и методика. Опыты проводили на 15- и 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах породы леггорн. Плазматические мембраны выделяли по методу Невила [12]. Печень извлекали, перфузировали 1 мМ NaHCO_3 (рН 7,5)—среда выделения (СВ). Ткань измельчали, добавляли 25 мл СВ на 5 г печени и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Гомогенат разводили СВ (на 10 г ткани 250 мл), встряхивали 2 мин и пропускали через 6 слоев марли.

Гомогенат центрифугировали при 1200 г 10 мин, надосадочную жидкость сливали, полученный розовый осадок мембран отделяли от нижнего коричневого слоя, суспендировали в среде для гомогенизации и центрифугировали при тех же условиях. Эту процедуру повторяли 3 раза.

Полученную фракцию, обогащенную плазматическими мембранами, суспендировали в воде и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы (d—1,20; 1,18; 1,16) при 100000 g в течение 90 мин на VАС-601. После центрифугирования на поверхности пробирки образуется жировая пленка, а в осадке—ядерные и митохондриальные фрагменты, а также неразрушенные клетки. В слое между растворами сахарозы с d—1,20 и 1,18 содержатся мембраны эндоплазматического ретикулама (микросомальная фракция). Плазматические мембраны собираются на границе слоев с d—1,16 и d—1,18. Осторожно удалив жировую пленку, отсасывали слой плазматических мембран, дважды промывали в воде и центрифугировали по 20 мин при 7000 g.

АТФазную активность определяли в среде, содержащей (в мМ): MgCl_2 —6, NaCl —100, KCl —20, CaCl_2 —20, АТФ—2 мг на пробу и 40 мМ трис-НСI буфера (рН 7,4). Смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин. Реакцию приостанавливали добавлением 5%-ного охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты. Об активности фермента судили по нарастанию неорганического фосфата в реакционной смеси. Неорганический фосфат определяли по Лоури и Лопес [10]. Данные пересчитывали на мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [11].

Для изучения влияния детергентов на АТФазную активность фракцию плазматических мембран преинкубировали в присутствии 1%-ного раствора дезоксихолата и третона X-100 в течение 20 мин, после чего проводилось определение ферментативной активности.

Результаты и обсуждение. Результаты наших экспериментов, приведенные в табл. 1 и 2, показывают, что АТРазная активность плазматических мембран печени без добавления ионов (контроль) сравнительно низкая, однако по ходу развития она возрастает, достигая максимальной величины у половозрелых кур. В присутствии Na^+ , K^+ , Mg^{2+}

Таблица 1

АТРазная активность плазматических мембран печени в эмбриональном периоде развития кур, Р в мкатамах/мг белка/30 мин

Условия опыта	15-дневные эмбрионы			20-дневные эмбрионы		
	Контроль	Тритон X-100	Дезокси-холат	Контроль	Тритон X-100	Дезокси-холат
Na^+ , K^+	25,5±0,5	16,4±0,46 P<0,001	24,4±1,28 P<0,500	32,6±1,37	35,3±0,67 P<0,200	32,7±1,32
Na^+ , K^+ +уабанин	26,5±0,33	16,3±0,76 P<0,001	27,1±1,74 P<0,500	32,0±1,26	35,6±0,78 P<0,100	31,0±1,07
Mg^{2+}	42,2±0,90	49,1±0,90 P<0,010	37,0±1,00 P<0,025	35,7±0,60	40,5±0,54 P<0,005	38,0±1,62 P<0,400
Ca^{2+}	20,0±0,58	30,2±0,51 P<0,001	10,0±0,56 P<0,001	16,7±0,90	17,6±0,54 P<0,500	16,0±0,77
Без добавления ионов	6,18±0,23	9,3±0,30 P<0,001	4,35±0,28 P<0,001	11,0±0,65	9,33±0,35 P<0,050	9,8±0,50 P<0,400

Таблица 2

АТРазная активность плазматических мембран печени в постэмбриональном периоде развития кур, Р в мкатамах/мг белка/30 мин

Условия опыта	5-дневные цыплята			Куры		
	Контроль	Тритон X-100	Дезокси-холат	Контроль	Тритон X-100	Дезокси-холат
Na^+ , K^+	38,4±1,03	44,2±0,45 P<0,001	42,8±1,26 P<0,005	41,0±1,30	58,0±0,50 P<0,001	52,0±1,30
Na^+ , K^+ +уабанин	38,5±0,86	43,8±0,45 P<0,005	42,5±1,20 P<0,050	41,0±1,28	58,8±0,58 P<0,001	51,6±1,16 P<0,005
Mg^{2+}	42,3±1,12	50,0±0,65 P<0,005	52,3±1,92 P<0,005	49,6±0,83	62,0±0,62 P<0,001	59,0±0,58 P<0,001
Ca^{2+}	20,0±0,70	26,0±0,70 P<0,005	23,8±1,08 P<0,050	29,8±0,69	38,0±0,40 P<0,001	30,0±0,59 P<0,500
Без добавления ионов	12,4±0,93	18,0±0,42 P<0,200	10,4±0,60 P<0,100	18,0±0,70	23,4±0,55 P<0,005	20,0±0,75 P<0,200

и Ca^{2+} активность фермента значительно возрастает, причем Mg^{2+} активизирует гидролиз АТР в большей степени, чем Na^+ , K^+ и Ca^{2+} .

Аналогичное активирование АТРаза ионами Mg^{2+} на плазматических мембранах, выделенных из печени крыс, получено другими авторами [6, 7].

Известно, что максимальная активация Na^+ , K^+ -АТРаза имеет место при совместном действии Na^+ и K^+ , которые эффективны соот-

ветственно на внутренней и внешней поверхности клеточной мембраны и устраняются добавлением убаина. Na^+ , K^+ -АТРаза, чувствительная к убаину, является маркером плазматических мембран и присутствует в поверхностной мембране любой животной клетки. Однако есть предположение, что убаин невозможно использовать в качестве маркера из-за высокой активности нечувствительной к убаину АТРаза [2]. Активный ионный транспорт в цитактных клетках и Na^+ , K^+ -активируемое расщепление АТР мембранными фрагментами ингибируются малыми концентрациями кардиоактивных гликозидов [8, 9, 14—16].

В опытах, проведенных на интактных клетках, показано, что гликозиды тормозят работу Na^+ , K^+ -АТРаза только при действии на наружную поверхность мембраны [5, 13, 17], на внутренних поверхностях этих мембран фермент отсутствует.

В наших экспериментах убаин в концентрации 1 мМ не ингибировал Na^+ , K^+ -АТРаза. Увеличение концентрации убаина от 2 до 100 мМ существенного эффекта не дало. Вероятно, при разрыве клетки и образовании из поверхностных мембран пузырьков ориентация мембраны может остаться прежней или, наоборот, измениться таким образом, что ее наружная поверхность окажется внутри пузырька. При этом выявление маркерных ферментов, локализованных на этой поверхности мембраны, может быть затруднено, если мембрана непроницаема для их субстратов [4]. Сопоставляя вышесказанное с нашими данными, можно заключить, что условия гомогенизации в наших опытах способствуют получению мембран в везикулярной форме, вследствие чего убаин не подавляет активность Na^+ , K^+ -АТРаза. Подтверждением этого предположения является отсутствие 5-нуклеотидазной активности (наиболее широко применяемого маркера плазматических мембран) в наших экспериментах во все исследованные сроки развития кур. Из литературных данных известно, что активность 5-нуклеотидазы обнаружена лишь на наружной поверхности плазматической мембраны, что вполне согласуется с результатами наших экспериментов [19].

В последнее время для получения Na^+ , K^+ -активируемой АТРаза в растворимом состоянии или повышения ее активности в суспензии все чаще используют различные поверхностно-активные вещества, которые воздействуют на гидрофобные связи в мембране, что способствует освобождению тех или иных мембранных белков (в том числе ферментов), сопровождающемуся изменением ферментативной активности [1, 18]. В этом плане нас заинтересовало изучение влияния тритона X-100 и дезоксихолата на активность АТРаза плазматических мембран. Как следует из табл. 1 и 2, эти детергенты в использованной концентрации по-разному влияют на активность фермента.

При отсутствии ионов тритон X-100 активировал фермент только в постэмбриональном периоде развития, тогда как дезоксихолат ингибировал ферментативную активность во все сроки развития. В присутствии Mg^{2+} и Ca^{2+} тритон X-100 на 15-й день развития заметно активировал фермент, однако при наличии Na^+ , K^+ активность АТРаза подавлялась. В последующие периоды развития тритон X-100 активировал Na^+ , K^+ ; Mg^{2+} и Ca^{2+} -АТРаза плазматических мембран.

При инкубировании мембран в присутствии Mg^{2+} или Na^+ , K^+ и дезоксихолата активность фермента по ходу развития варьирует. В эмбриональном периоде она не изменяется, в раннем постнатальном периоде и у кур в присутствии дезоксихолата активность фермента несколько повышается.

Интересно было проследить за изменением активности АТРаза при добавлении Ca^{2+} и дезоксихолата. На 15-й день инкубации дезоксихолат ингибировал активность фермента на 50% по сравнению с контролем, на 20-й день эмбрионального развития АТРазная активность оставалась неизменной; после вылупления, у 5-дневных цыплят, дезоксихолат несколько активировал фермент, однако у кур эта разница инвектировалась.

Увеличение активности фермента по ходу развития кур коррелировало с увеличением количества ферментного белка (рис.), которое у кур по сравнению с 15-дневными эмбрионами возрастало на 58,6%.

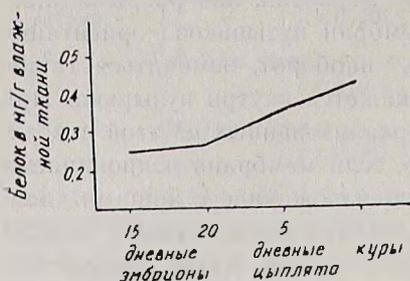


Рис. Изменение количества белка плазматических мембран печени кур по ходу развития.

Таким образом, Na^+ , K^+ -АТРазная активность в плазматических мембранах печени по ходу эмбрионального и постэмбрионального развития постепенно возрастает, достигая максимума в ткани половозрелых кур. Mg^{2+} или Ca^{2+} -активируемая АТРазная активность в мембранах 15-дневных эмбрионов высокая, в дальнейшем, у 20-дневных, она несколько подавляется. Аналогичная картина наблюдается в контрольных опытах, при этом АТРазная активность плазматических мембран печени 5-дневных цыплят и кур по сравнению с 20-дневными эмбрионами повышается. Инкубация плазматических мембран в присутствии тритона X-100 и дезоксихолата в разные сроки развития неодинаково влияет на активность АТРаза, активируемой разными ионами.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 10.II 1983 г.

ՀԱՎԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ՊԼԱԶՄԱՏԻԿ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ԱՏՔ-ԱԶՍՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ

Թ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են տարբեր իոններով ակտիվացող ԱՏՔ-ազային ակտիվությունը փոփոխությունները հավերի սաղմնային և հետսաղմնային զարգացման ընթացքում: Ցույց է տրվել, որ Na^+ , K^+ -ակտիվացող և Mg^{2+} -կախված ԱՏՔ-ազային ակտիվությունը լյարդի պլազմատիկ թաղանթում զար-

դացման ընթացքում աստիճանաբար աճում է՝ առավելագույն չափի հասնելով սեռահաստուն հավերի հյուսվածքում: Ակտիվության համանման պատկեր դիտվում է նաև իոնների և ուաբաինի համատեղ ավելացման դեպքում: Mg^{2+} կամ Ca^{2+} - ակտիվացող ԱՏՔ-ազային ակտիվությունը բարձր է 15 օրական սաղմի լյարդի պլազմատիկ թաղանթներում, հետագա զարգացման ընթացքում ֆերմենտի ակտիվությունը որոշ չափով ճնշվում է: Փորձում ավելացված տրիտոն X-100-ը և դեզօքսիխոլատը տարբեր ազդեցություն են ունենում առանձին իոններով ակտիվացող ԱՏՔ-ազայի վրա:

ATP-ase ACTIVITY OF PLASMATIC MEMBRANES OF HENS LIVER TISSUE IN ONTOGENESIS

R. A. STEPANIAN, A. A. SIMONIAN

The influence of activators (Na^+ , K^+ ; Mg^{2+} and Ca^{2+}) and detergents (triton X-100 and desoxicholate) on the ATP-ase activity of plasmatic membranes of hen liver has been investigated. The maximum activity of Na^+ , K^+ -activated ATP-ase has been found in post-embryonic period, in 5-day-old chicken.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Курсенко О. В., Вавилова Г. Л., Ярошенко Н. А. Успехи нейрохимии, 118, 1974.
2. Невилл Д. Биохимическое исследование мембран, 30, М., 1979.
3. Степанян Р. А., Симонян А. А., Агаджанов Л. И., Симонян Р. А. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 818, 1981.
4. De Pierre I. W., Karnovsky M. L. J. Cell. Biol., 55, 275, 1973.
5. Dunham P. B., Hoffman J. F., J. Gen. Physiol., 58, 94, 1971.
6. Emmelot B., Bos C. I. Biochim. Biophys. Acta, 120, 369, 1966.
7. Ewans W. H. Biochem. J., 116, 833, 1970.
8. Glynn J. M. J. Physiol. 136, 148, 1957.
9. Hoffman J. F., J. Gen. Physiol., 45, 837, 1962.
10. Lowry O. H., Lopes J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265 1951.
12. Neville D. M. Jr J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 413, 1960.
13. Okarma T. B., Tramell P., Kalman S. M. Molec. Pharmacol., 8, 476, 1972.
14. Panet R., Selinger E. Biochim. Biophys. Acta, 255, 34, 1972.
15. Repke K., Portius H. J. Experientia, 19, 452, 1963.
16. Skou I. C. Biochim. Biophys. Acta, 23, 394, 1957.
17. Whittam R. Biochem. J., 84, 110, 1962.
18. Widnell C. C., Unkeless J. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 68, 1833, 1968.
19. Widnell C. C. J. Cell. Biol., 52, 542, 1972.