

Хельги КУУС, Ило СИБУЛЬ, Анна ТАММ

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКТО-АПИРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЦЫПЛЯТ

Большая роль в обменных процессах, происходящих в эритроцитах, принадлежит ферментам группы аденозинтрифосфатаз (АТФаз), с действием которых связано расщепление макроэргических связей АТФ и использование их энергии для разнообразных физиологических функций клетки. Наряду с внутриклеточными АТФазами на поверхности интактных эритроцитов обнаружена также АТФаза, действие которой направлено на АТФ окружающей среды (Clarkson, Maizels, 1952; Венкстерн, Энгельгардт, 1955, 1957; Herbert, 1956; Авраимова, 1960; Дворкин, 1960; Серебренникова, 1962; Hoffman, 1962). Согласно классификации ферментов она обозначается как аденилпирифосфатаза (сокр. апираза).

Т. В. Венкстерн и В. А. Энгельгардт (1955, 1957), выявившие этот фермент у ядерных эритроцитов, назвали его экто-аденозинполифосфатазой и высказали предположение о его существенном значении в жизнедеятельности клетки. Они установили, что такой фермент с практически одинаковой скоростью отщепляет от АТФ оба лабильных фосфорных остатка. Экто-апиразная активность свойственна и безъядерным красным кровяным клеткам, но при количественном сопоставлении выяснено, что у неповрежденного эритроцита голубя она в 30—100 раз больше, чем у кровяной клетки человека (Herbert, 1956; Венкстерн, Энгельгардт, 1957; Авраимова, 1960; Дворкин, 1967). Кроме того, апираза обнаружена и на внешней поверхности асцитических раковых клеток (Акс и др., 1954), лейкоцитов (Луганова и др., 1957) и тромбоцитов человека (Черняк, 1967; Chambers и др., 1967).

Данные об энзиматических свойствах экто-фермента противоречивы (Clarkson, Maizels, 1952; Венкстерн, Энгельгардт, 1955; Herbert, 1956; Луганова и др., 1957; Chambers и др., 1967). Нами установлены оптимальные условия для протекания данной ферментативной реакции на красных кровяных клетках цыплят. Поскольку некоторыми авторами (Шабалов, Осипов, 1967; Вишняков, 1974; Gupta и др., 1974) выявлены возрастные изменения АТФазной активности эритроцитов млекопитающих, то представляет интерес исследовать этот вопрос и в случае экто-апиразы красных кровяных клеток цыплят совокупно с изучением роста и развития бройлеров в постнатальном онтогенезе.

Методика

Исследовали эритроциты 125 цыплят бройлеров в течение трех месяцев после их вылупления. Кровь получали в результате декапитации птиц. Антисвертывающим средством служил гепарин фирмы «Спофа». Эритроциты отделяли центрифугированием, после чего их три раза промывали двумя объемами ледяного физиологического раст-

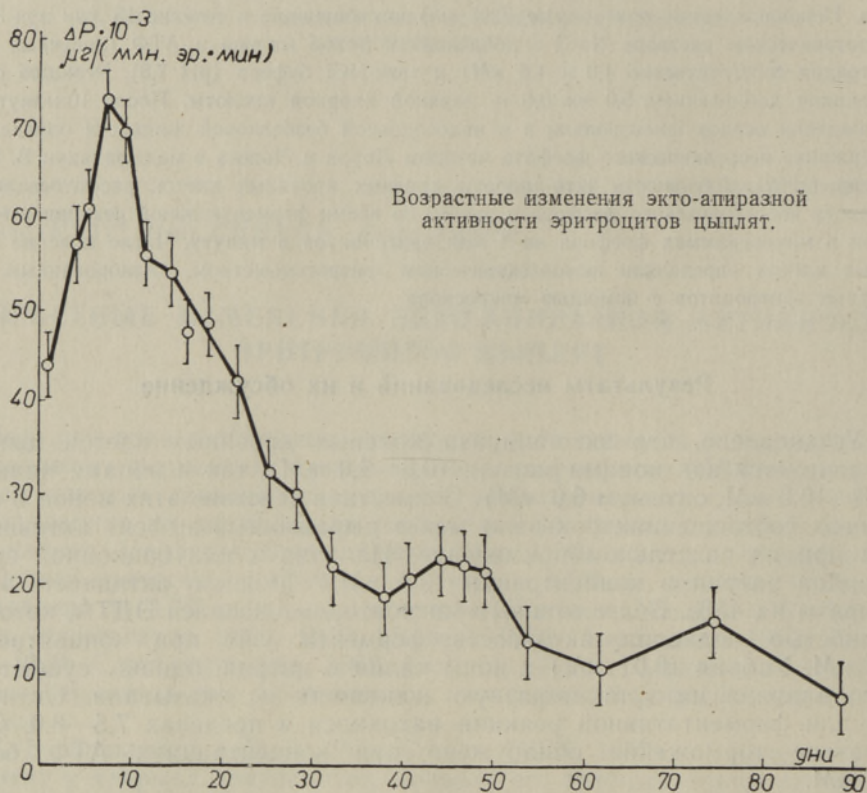
вора. Неповрежденные эритроциты (0,05 мл) инкубировали в течение 15 мин при 37 °С в изотоническом растворе NaCl с добавлением ионов магния и АТФ (конечные концентрации соответственно 1,0 и 1,6 мМ) и трис-НСl буфера (рН 7,8). Реакцию останавливали добавлением 5,0 мл 0,6 н. ледяной хлорной кислоты. После 10-минутного охлаждения осадок фильтровали и в надосадочной безбелковой жидкости определяли содержание неорганического фосфата методом Лоури и Лопеса в модификации В. Скулачева (1962). Активность экто-апиразы красных кровяных клеток рассчитывали по приросту неорганического фосфора в пробах во время ферментативной реакции и выражали в микрограммах фосфора на 1 млн эритроцитов в минуту. Число красных кровяных клеток определяли фотоэлектрическим эритрогемометром, калиброванным для ядерных эритроцитов с помощью микроскопа.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что экто-апираза красных кровяных клеток цыплят активируется как ионами магния (0,5—5,0 мМ), так и ионами кальция (1,0—10,0 мМ, оптимум 6,0 мМ). Совместное действие этих ионов в различных соотношениях показало менее выраженный эффект активации, чем при их раздельном применении. Наличие в инкубационной среде фторида натрия в концентрации 10,0 мМ тормозило активность экто-апиразы на 45%. Более мощным ингибитором оказался ЭДТА, который полностью подавлял активность фермента уже при концентрации 1,0 мМ. Уабаин (0,01 мМ) и ионы калия и натрия, однако, существенного влияния на экто-апиразную активность не оказывали. Оптимум рН для ферментативной реакции находился в пределах 7,5—8,0. Субстратное торможение обнаружено при концентрациях АТФ более 2,5 мМ.

Исследование изменений активности поверхностно-локализованного фермента эритроцитов в связи с возрастом цыплят выявило резкие сдвиги ее в ранний постнатальный период (рисунок). В течение 8 дней активность экто-апиразы красных кровяных клеток цыплят повышалась на 66% ($P < 0,001$) по сравнению с активностью ее в первый день. Затем следовало понижение активности до первоначального уровня, который достигался на 20-й день опыта. С дальнейшим ростом цыплят снижение ферментативной активности продолжалось (на 38-й день до 42% от исходного уровня ($P < 0,02$)). Второе повышение (небольшое) отмечалось в период с 38-го по 54-й день, причем экто-апиразная активность эритроцитов достигала 123% по сравнению с ее активностью на 38-й день. С 54-го дня активность фермента стабилизировалась на уровне, характерном для взрослых кур (0,013 $\mu\text{g P}$ на 1 млн эритроцитов в минуту).

После вылупления цыплят в процессе адаптации красных кровяных клеток к постнатальным условиям внешней среды отмечены изменения как клеточной мембраны, так и количественного состава эритроцитов (Oshima и др., 1964; Иванникова и др., 1968; Isaacks и др., 1976). На наш взгляд, одним из возможных объяснений существующих сдвигов экто-апиразной активности красной крови цыплят в раннем постнатальном онтогенезе являются указанные изменения в ходе обновления эритроцитов. Можно предположить, что первое повышение ферментативной активности связано с поступлением в циркулирующую кровь большого числа новых красных кровяных клеток с более высокой экто-апиразной активностью, чему следует появление эритроцитов с меньшей активностью фермента. Эти явления сопровождаются постоянным разрушением эмбриональных красных кровяных клеток, в результате чего суммарная экто-апиразная активность постепенно снижается до стабиль-



ного уровня. Установленный нами период перехода максимальной ферментативной активности к минимальной полностью согласуется с продолжительностью жизненного цикла эритроцитов цыплят, который в среднем составляет 30 дней (Reddy и др., 1975).

Биологическая функция экто-апиразы до настоящего времени окончательно не выяснена. Однако довольно большое количество видов клеток, на поверхности которых локализован этот фермент, свидетельствует о его значительной роли в жизнедеятельности клетки. Т. В. Венкстерн и В. А. Энгельгардт в 1955 году высказали предположение, что экто-апираза участвует в регуляции проницаемости клеточных оболочек или обмена адениловых соединений в окружающей среде. Другая возможная функция экто-фермента эритроцитов может состоять в синтезе АТФ мембраной (Chambers и др., 1967).

Обстоятельство, что активность экто-апиразы красных кровяных клеток цыплят после их вылупления превышала уровень ее у взрослых кур в 3—5 раз, позволяет связать действие этого фермента с приспособлением эритроцитов к особенностям обменных процессов молодого организма. В этот же период в красных кровяных клетках цыплят обнаружены и изменения химического состава, выражающиеся в повышении концентраций АТФ и фитиновой кислоты и в значительном снижении содержания 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (Oshima и др., 1964; Isaacks и др., 1976). Совпадение наших данных о динамике активности изучаемой экто-апиразы с результатами этих авторов можно рассматривать как единый комплекс адаптационных явлений у эритроцитов в ранний постнатальный период развития цыплят.

ЛИТЕРАТУРА

- Авраамова Т. В., 1960. Активность аденозинтрифосфатазы и глицерофосфатазы эритроцитов крови здоровых и больных раком. В сб.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. Красноярск : 401—405.
- Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А., 1955. Поверхностно-локализованная аденозинполифосфатаза ядерных эритроцитов. Докл. АН СССР 102 (1) : 133—136.
- Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А., 1957. Распространение экто-аденозинполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. Биохимия 22 (5) : 911—916.
- Вишняков С. И., 1974. АТФазная активность, соотношение Na/K и аминокислотный состав теней эритроцитов в крови коров и телят. С.-х. биология 9 (4) : 590—594.
- Дворкин Г. А., 1960. Влияние ультразвуковых волн на физико-химические и ферментативные свойства поверхностных слоев эритроцитов. В сб.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. Красноярск : 35—46.
- Иванникова Л. Г., Орлова Л. В., Тринчер К. С., 1968. Изменения эритроцитов разных видов животных в онтогенезе. Биофизика 13 (4) : 651—655.
- Луганова И. С., Сейц И. Ф., Теодорович В. И., 1957. Поверхностно-локализованная аденилпирофосфатаза в лейкоцитах. Докл. АН СССР 113 (1) : 149—151.
- Серебrenникова И. А., 1962. Поверхностно-локализованная аденозинтрифосфатаза эритроцитов при лучевой болезни. В сб.: Действие на организм высокоэнергетического излучения. Томск : 84—88.
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.
- Черняк Н. Б., 1967. Активность АТФазы кровяных пластинок человека. Вопр. мед. хим. 13 (5) : 530—535.
- Шабалов Н. П., Осипов А. И., 1967. Аденозинтрифосфатазная активность эритроцитов у здоровых детей различного возраста. Педиатрия 46 (3) : 64—65.
- Acs, S., Ostrowsky, W., Straub, F. B., 1954. Über die Adenylpyrophosphataseaktivität an der Oberfläche der Aszites-Krebszellen. Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 6 (2—3) : 261—263.
- Chambers, D. A., Salzman, E. W., Neri, L. L., 1967. Characterization of "ecto-ATPase" of human blood platelets. Arch. Biochem. Biophys. 119 (1—3) : 173—178.
- Clarkson, E. M., Maizels, M., 1952. Distribution of phosphatase in human erythrocytes. J. Physiol. 116 (112—128).
- Gupta, J. D., Peterson, V. J., Harley, J. D., 1974. Erythrocytic ouabain-sensitive and ouabain-insensitive adenosine triphosphatase in various mammals. Comp. Biochem. and Physiol. A47 (3) : 1123—1126.
- Herbert, E., 1956. A study of the liberation of orthophosphate from adenosine triphosphate by the stromata of human erythrocytes. J. Cell. Comp. Physiol. 47 (1) : 11—36.
- Hoffman, J. F., 1962. Cation transport and structure of the red-cell plasma membrane. Circulation 26 (5) : 1201—1213.
- Isaacks, R. E., Harkness, D. R., Froeman, G. A., Goldman, P. H., Adler, J. L., Sussman, S. A., Roth, S., 1976. Studies on avian erythrocyte metabolism. II. Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and oxygen affinity of whole blood in chick embryos and chicks. Comp. Biochem. and Physiol. A53 (2) : 151—156.
- Reddy, P. R. K., van Krey, H. P., Gross, W. B., Siegel, P. B., 1975. Erythrocyte lifespan in dwarf and normal pullets from growth selected lines of chickens. Poultry Sci. 54 (4) : 1301—1303.

Helgi KUUS, Ilo SIBUL, Anna TAMM

TIBU ERÜTROTSÜÜTIDE EKTOAPÜRAASSE AKTIIVSUSE EALISED MUUTUSED

Resümee

Tibu erütrotsüütide ektoapüraasse aktiivsuse uurimiseks selgitati selle fermentreaktsiooni optimaalsed tingimused. Fermendi aktivaatoriteks osutusid Mg^{++} ja Ca^{++} , inhibiitoriteks EDTA ja NaF. Fermentreaktsiooniks sobiv pH asus vahemikus 7,5–8,0. Ouabain ning K- ja Na-ioonid olulist mõju ei avaldanud; substraatne inhibeerimine esines ATP kontsentratsioonil üle 2,5 mM.

Erineva vanusega tibude erütrotsüütide ektoapüraases aktiivsuses ilmnes suuri lahkuminekuid. Näiteks ületas kõnealuse fermendi aktiivsus koorumisjärgselt 3-kordselt ning esimese elunädala lõpul 5-kordselt pärast 54. katsepäeva täheldatud nivoo.

Kuigi erütrotsüütide ektoapüraasi funktsioon ei ole veel selge, võimaldavad esitatud andmed seostada selle fermendi aktiivsuse ealise dünaamika adaptatsiooninähtustega punastes verelibledes linnu arengu varasel postnataalsel perioodil.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
4. III 1977

Helgi KUUS, Ilo SIBUL, Anna TAMM

AGE DEPENDENT CHANGES IN ECTO-APYRASE ACTIVITY OF CHICK ERYTHROCYTES

Summary

In order to investigate ecto-apyrase activity of chick erythrocytes, it was necessary to clear up the optimal conditions for the fermentation reaction. The enzyme was found to be Mg^{++} - and Ca^{++} -dependent, it was blocked by EDTA and NaF, and had maximal activity in the pH range of 7.5–8.0. Ouabain and K, Na ions had no effect. The substrate inhibition became obvious at ATP concentrations over 2.5 mM.

Experimental data showed that there exists a large variation in the ecto-apyrase activity of erythrocytes of chickens of a different age. Thus, after hatching and at the end of the first week of age, the activity of the enzyme had exceeded the stabilized level after the 54-day observation period 3- and 5-fold, respectively.

Although the function of the erythrocyte ecto-apyrase remains to be established, on the basis of the presented information the age dependent changes in the enzyme activity may be observed in connection with adaptation phenomena of red cells in the early postnatal period of the fowl development.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
March 4, 1977