

УДК 577.1:636.5

UDC 577.1:636.5

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
АТФАЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЦЫПЛЯТ-
БРОЙЛЕРОВ**

**PECULIARITIES OF ERYTHROCYTE
ATPASE FUNCTIONING OF CHICKEN-
BROILERS**

Мосягин В.В.
к. б. н., доцент

Mosyagin V.V.
Cand. Biol. Sci., assistant professor

*Курский институт социального образования
(филиал) РГСУ, Курск, Россия*

*Kursk institute of social education (branch) RGSU,
Kursk, Russia*

В статье рассматриваются особенности функционирования АТФаз эритроцитов цыплят-бройлеров. Предложен метод выделения цитоплазматических мембран и ядер эритроцитов цыплят-бройлеров. Представлены данные о влиянии ионов Na^+ и K^+ на активность общей АТФазы эритроцитов и АТФаз, локализованных в цитоплазматической и ядерной мембранах.

Peculiarities of functioning of ATPase of erythrocyte of chicken-broilers are considered in the article. Method of discharge of cytoplasmic membranes and nuclei of erythrocytes of chicken-broilers was proposed. Data on influence of ions Na^+ and K^+ on activity of general ATPase, localized in cytoplasmic and nuclear membranes were presented.

Ключевые слова: АТФАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, Na/K -АТФАЗА, ЭРИТРОЦИТЫ, ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРЫ, ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА, ЯДРА.

Key words: ATPASE ACTIVITY, Na/K -ATPASE, ERYTHROCYTES, CHICKENS-BROILERS, CYTOPLASMIC MEMBRANE, NUCLEI.

Известно, что ионный состав внутриклеточной и внеклеточной среды имеет существенные различия, особенно в отношении одновалентных катионов натрия и калия. Ионная асимметрия используется для генерации возбуждения в нервных и мышечных клетках, а также является движущей силой для работы белков-переносчиков, осуществляющих транспорт аминокислот и сахаров в клетку [1].

Создание градиента концентраций ионов натрия и калия по обе стороны мембраны осуществляется активным транспортом этих ионов против их электрохимических градиентов специальным ферментом – Na/K -АТФазой, использующей энергию макроэргических связей АТФ. Наибольшая активность Na/K -АТФазы обнаружена в возбудимых и секреторных тканях: мозге, электрическом органе, почках, солевых железах [2]. На активность Na/K -АТФазы существенное влияние оказывают многие факторы: соотношение ионов натрия и калия, количество доступного АТФ и др. Специфическими ингибиторами Na/K -АТФазы служат убаин (строфантин-Г) и <http://ej.kubagro.ru/2008/01/pdf/03.pdf>

другие сердечные гликозиды, а также эндогенные дигиталисоподобные факторы [1, 3, 4, 5].

Наиболее удобными объектами для изучения функционирования Na/K-АТФазы являются препараты, получаемые из эритроцитов, почек и мозга, что связано с легкостью получения достаточно активных мембранных препаратов из этих объектов [4].

Однако изучение функционирования Na/K-АТФаз эритроцитов цыплят-бройлеров затруднено, так как применение специфического ингибитора этой аденозинтрифосфатазы – убаина (строфантина-G) в концентрации 2,0–100,0 *ммоль* не вызывает существенного подавления активности АТФазы, выделенной из тканей цыплят [6, 7].

Такая нечувствительность к убаину, по-видимому, объясняется существованием, по крайней мере, двух видов АТФаз, связанных с транспортом натрия. Одна из них – классическая Na/K-АТФаза – чувствительна к убаину, а другая – Na-транспортирующая АТФаза – не нуждается для своей работы в ионах калия [8].

Особенности работы Na/K-АТФазы эритроцитов птиц связаны с их более сложным строением, заключающимся в наличии ядра, а в молодых эритроцитах – и митохондрий. Вследствие чего возрастные изменения морфологии и функции эритроцитов птиц изучены недостаточно [9].

Выделение субклеточных структур эритроцитов птицы сопряжено с определенными трудностями. Так, методы, предполагающие для разрушения цитоплазматических мембран эритроцитов использование детергентов (сапонин, тритон X-100) [10, 11], оказались неприемлемы, так как, по нашим данным, применение детергентов приводило к полному разрушению цитоплазматических и ядерных мембран эритроцитов. Использование метода получения теней эритроцитов млекопитающих [12] путем гемолиза эрит-

роцитов дистиллированной водой приводило в наших опытах к агглютинации мембранных структур.

Цель исследования – изучить влияние ионов Na^+ , K^+ и Mg^{2+} на активность общей АТФазы эритроцитов и активность АТФаз ядер и цитоплазматических мембран эритроцитов цыплят-бройлеров.

Методика исследований. Исследования проводили на 20 цыплятах кросса «Бройлер-6» на базе птицефабрики «Курская» Курской области. Условия содержания и кормления соответствовали действующим нормативам.

Кровь для исследований у цыплят брали из вен шеи. Отделение эритроцитов от плазмы проводили путем центрифугирования в рефрижераторной центрифуге ($t = 10^{\circ}\text{C}$) в течение 30 мин при 3000 оборотах. Эритроциты после отделения от плазмы двукратно отмывали физиологическим раствором.

Активность АТФаз оценивали по приросту неорганического фосфата (Фн) после инкубации при 37°C и выражали в *ммоль $\Phi_{\text{н}} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$* [13]. Неорганический фосфат определяли спектрофотометрически [14]. Концентрацию белка устанавливали спектрофотометрическим методом Варбурга и Кристиана [15].

Результаты исследований. Результаты исследований по влиянию различных концентраций ионов Na^+ , K^+ и Mg^{2+} на активность общей АТФазы эритроцитов цыплят-бройлеров, представленные на рисунке 1, показывают, что ионы натрия, калия и магния оказывают активирующее действие на активность АТФазы в разных диапазонах концентраций. Так, максимальная АТФазная активность проявлялась при концентрациях ионов: натрия – $115\text{--}145 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$, калия – $17\text{--}22$, магния – $3,0\text{--}4,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Результаты изучения комбинаций оптимальных концентраций этих ионов представлены в таблице 1. Максимальная АТФазная активность отмечена в инкубационной среде, содержащей: Na^+ – $120 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}$, K^+ – 20

ммоль·мл; Mg^{2+} – 3,0 ммоль·мл, и составляла $9,24 \pm 0,23$ нмоль $\Phi_n \cdot мг\ белка^{-1} \cdot мин^{-1}$.

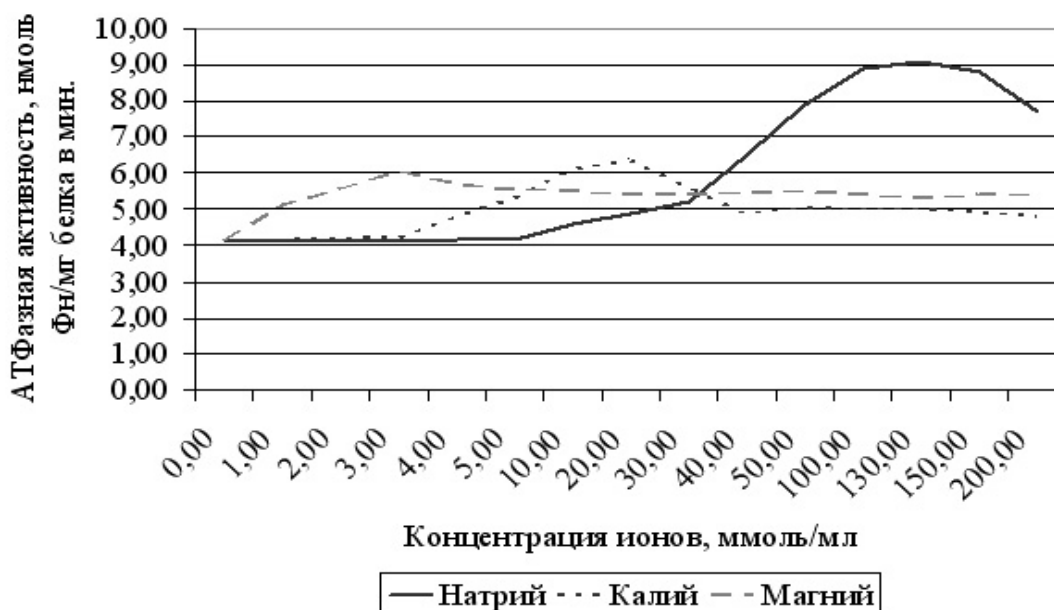


Рисунок 1 – АТФазная активность эритроцитов при различных концентрациях ионов

Результаты, полученные нами, указывают на то, что основную регуляторную роль в активности фермента играют ионы натрия в сочетании с ионами магния, ионы калия оказывают значительно меньшее влияние на активность АТФазы.

Таблица 1 – Влияние комбинаций ионного состава на активность АТФазы

№ среды	Ионы инкубационной среды	Активность АТФазы, нмоль $\Phi_n \cdot мг\ белка^{-1} \cdot мин^{-1}$
1	Na^+, K^+, Mg^{2+}	$9,24 \pm 0,23$
2	Na^+, Mg^{2+}	$8,56 \pm 0,21$
3	K^+, Mg^{2+}	$7,36 \pm 0,18$
4	Mg^{2+}	$5,96 \pm 0,15$
5	-	$5,12 \pm 0,11$

С целью изучения влияния ионов Na^+ и K^+ на активность АТФаз ядер и цитоплазматических мембран эритроцитов цыплят-бройлеров для выделения этих субклеточных структур был выбран метод замораживания – оттаивания в растворе сахарозы, содержащем $50 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ трис- H_2SO_4 буфер (рН 7,4), с последующим центрифугированием в течение 30 мин при $1000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$.

В результате проведения серии опытов было установлено, что оптимальным является $1,375 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ ($\rho=1,176$) раствор сахарозы, а наиболее полное разрушение клеток и выход ядер происходят при 3-кратном замораживании – оттаивании. При этих условиях получили чистую от не разрушенных клеток фракцию ядер. На рисунках 2–5 представлена микрокартина суспензии эритроцитов на разных стадиях замораживания – оттаивания.

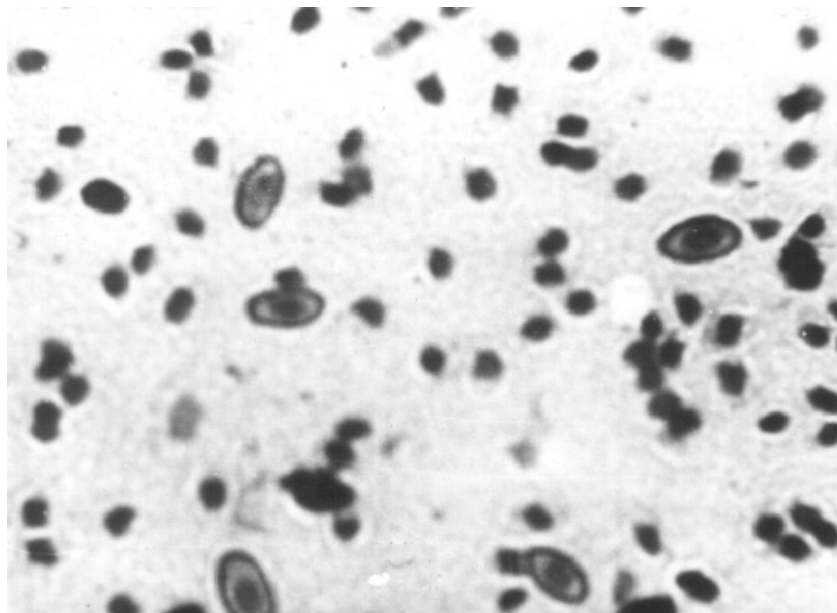


Рисунок 2 – Частичный гемолиз эритроцитов после первого замораживания – оттаивания. Видны не разрушенные эритроциты

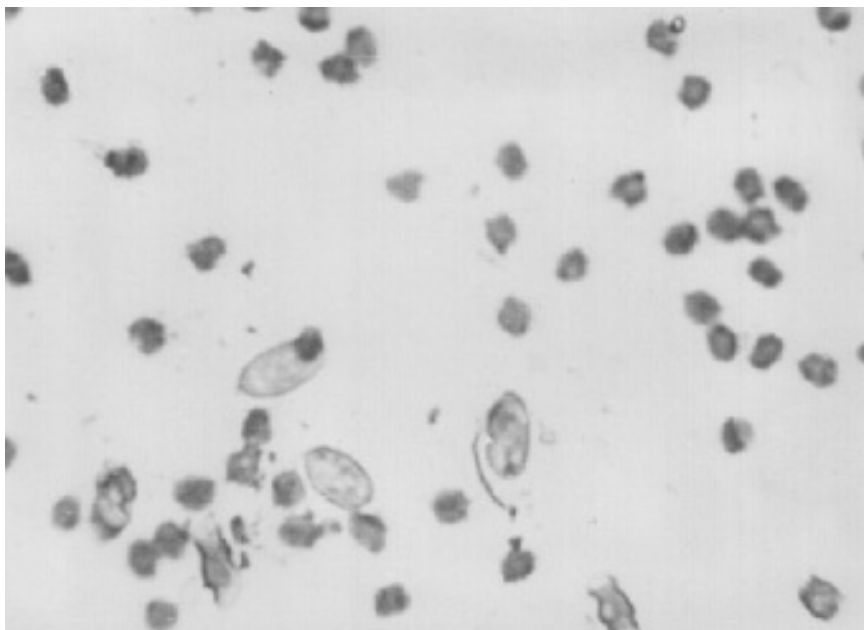


Рисунок 3 – Микроскопическая картина суспензии эритроцитов после второго замораживания – оттаивания. Тени эритроцитов и ядра

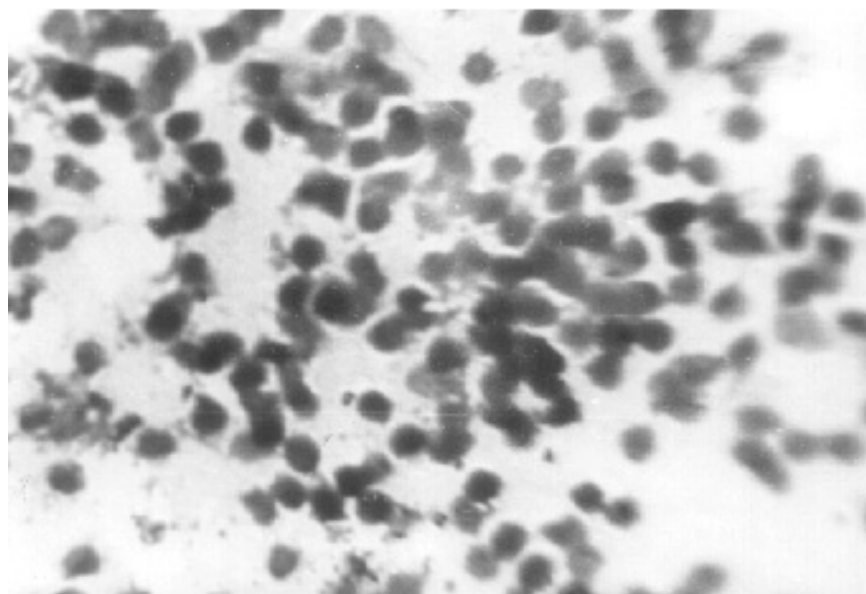


Рисунок 4 – В осадке ядра эритроцитов (после третьего замораживания – оттаивания и центрифугирования)

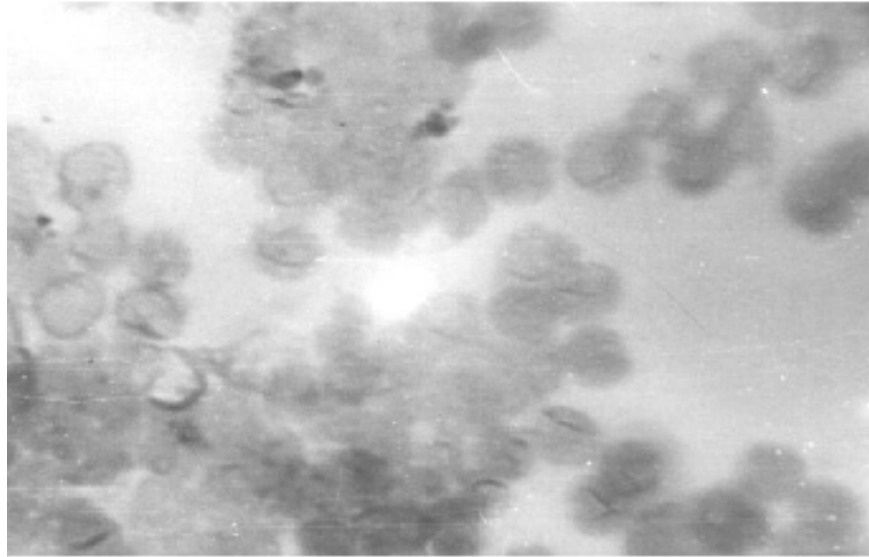


Рисунок 5 – В супернатанте тени эритроцитов (после третьего замораживания – оттаивания и центрифугирования)

На рисунке 6 представлены данные о влиянии ионов Na^+ и K^+ на активность АТФаз ядер и цитоплазматических мембран эритроцитов цыплят-бройлеров. Дисперсионным и регрессионным анализом полученных данных было установлено, что замена в среде инкубации ионов Na^+ на ионы K^+ не оказывает достоверного влияния на активность АТФазы ядер ($P > 0,05$). Это, по-видимому, связано с отсутствием в ядерных мембранах Na^+, K^+ -чувствительной АТФазы. Аналогичная замена ионов в среде инкубации цитоплазматических мембран эритроцитов приводила к достоверному изменению их АТФазной активности на $24,2 \pm 4,49\%$ ($P < 0,01$). Коэффициент регрессии (r_{xy}) составлял $0,657 \pm 0,285$ ($P < 0,05$), что характеризовало сильную зависимость АТФазной активности этих мембранных структур от концентрации ионов натрия и калия.

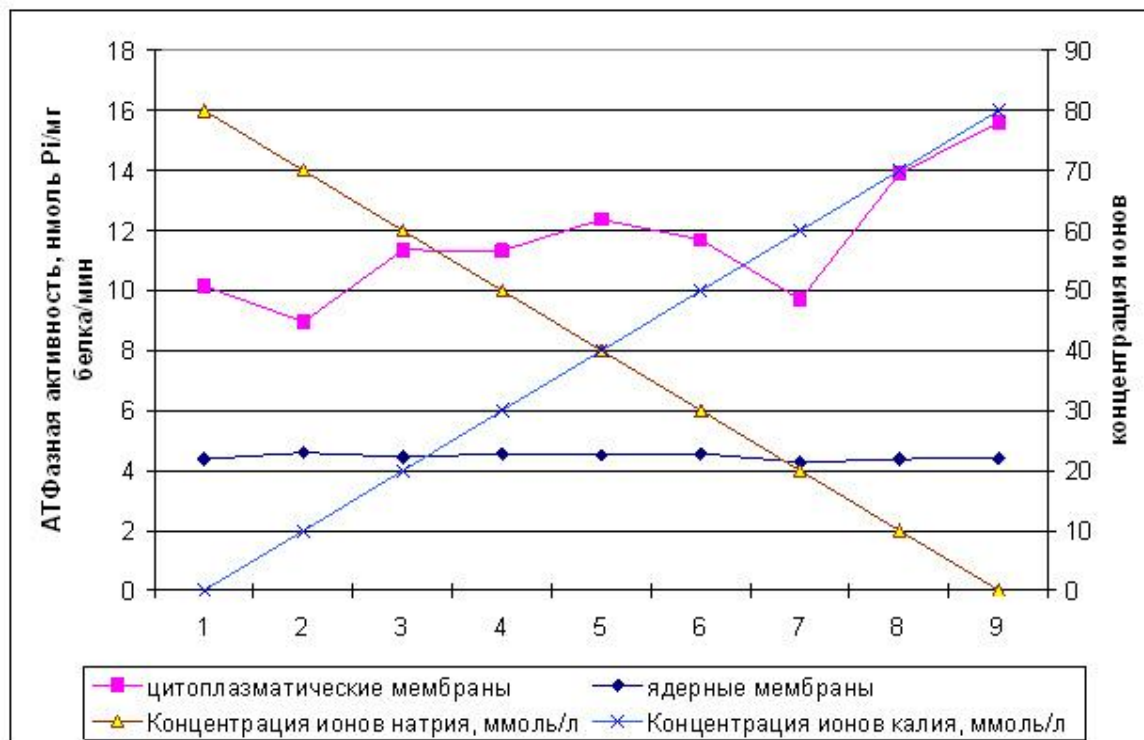


Рисунок 6 – Активности АТФаз ядерной и цитоплазматической мембран эритроцитов цыплят в средах различного ионного состава

Заключение. На активность АТФаз эритроцитов птиц существенное влияние оказывают ионы Na^+ , K^+ и Mg^{2+} . Основную регуляторную роль в активности фермента играют ионы натрия. Ионы калия оказывают значительно меньшее влияние на активность АТФазы.

АТФазы цитоплазматических и ядерных эритроцитов цыплят имеют существенные различия, проявляющиеся во влиянии на них ионов Na^+ и K^+ . Так, цитоплазматические мембраны эритроцитов содержат Na^+ , K^+ - чувствительную АТФазную компоненту, составляющую 24,2+4,5 % от общей АТФазной активности, в то время как в ядерных оболочках наличие такой системы не установлено.

Список литературы

1. Болдырев А.А. Na/K-АТФаза – свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 2–9.
2. Кометиани, З.П. Кинетика мембранных транспортных ферментов / З.П. Кометиани, М.Г. Векуа. – М.: Высш. шк., 1988. – 111 с.
3. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. – М.: МГУ, 1985. – 167 с.
4. Болдырев А.А. Современное состояние проблемы транспортных АТФаз и транспортные аденозинтрифосфатазы. – М.: МГУ, 1977. – 115 с.
5. Тапильская, Н.И. Эндогенные дигиталисоподобные ингибиторы Na/K-АТФазы – новый класс гормонов с широким спектром функций / Н.И. Тапильская, И.А. Егорова, А.Я. Багров // Цитокины и воспаление. – 2006. – № 3. – С. 3–9.
6. Степанян, Р.А. АТФазная активность плазматических мембран печеночной ткани кур в онтогенезе / Р.А. Степанян, А.А. Симонян // Биологический журнал Армении. – 1983. – № 10. – С. 830–834.
7. Фурман Ю.В. Технологические аспекты производства и использования кормовых добавок и биологически активных препаратов в животноводстве: Дисс. на соиск. уч. степ. док. биол. наук. – М., 2001. – 329 с.
8. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. – М.: Высш. школа, 1989. – 283 с.
9. Болотников, И.А. Гематология птиц / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. – Л.: Наука, 1980. – 116 с.
10. Шкорбатов, Ю.Г. Биоэлектрические свойства клеточных ядер / Ю.Г. Шкорбатов, В.Г. Шахбазов // Успехи современной биологии. – 1992. – Вып. 4. – С. 499–503.
11. Шкорбатов, Ю.Г. О роли нуклеиновых кислот и других биополимеров в образовании электрического заряда клеточного ядра / Ю.Г. Шкорбатов, В.Г. Шахбазов // Молекулярная генетика и биофизика. – 1982. – № 7. – С. 35–38.
12. Keeton K.S., Kaneko I.I. Characterization of adenosinetriphosphatase in erythrocyte membrane of the cow // Proc.Soc.Ekp.Biol. and Med. 1972. N 1. P. 140–145.
13. Иващенко, А.Т. Выделение и свойства аниончувствительной аденозинтрифосфатазы из мембран эритроцитов / А.Т. Иващенко, И.А. Бушнева // Биохимия. – 1981. – № 3. – С. 486–488.
14. Кондрашова, М.Н. Метод определения неорганического фосфата по спектрам поглощения молибдатных комплексов в ультрафиолете / М.Н. Кондрашова, М.Н. Лесогорова, С.Э. Шноль // Биохимия. – 1965. – № 3. – С. 567–572.
15. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот. – М.: Мир, 1991. – 544 с.