

Хельги КУУС, Ило СИБУЛЬ, Анна ТАММ

## ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭКТОАПИРАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЦЫПЛЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ С ТРИЙОДИТРОНИНОМ

Гормоны щитовидной железы являются активными соединениями, которые регулируют метаболизм большинства тканей в организме, но четкий механизм их действия остается еще неясным. При этом общепризнано, что тироксин и его аналоги способны взаимодействовать с мембранами и другими структурными элементами клетки (Рачев, Ещенко, 1975). Между тем выявлены и специфические связывающие места для них на поверхности изолированных клеток печени, а также регулирующая роль мембранных белков в транспорте названных гормонов через клеточные оболочки (Рао и др., 1976; Pliam, Goldfine, 1977). Поскольку предполагается (Венкстерн, Энгельгардт, 1955) участие эктоапиразы в регуляции проницаемости клеточных мембран, то представляет интерес исследовать влияние трийодтиронина ( $T_3$ ) на эктоапиразную активность эритроцитов цыплят-бройлеров вне организма. Данный вопрос возник и в связи с полученными нами *in vivo* изменениями эктоапиразной активности ядерных эритроцитов под действием  $T_3$  (Куус и др., 1979). Мы предполагали, что снижение активности энзима — это проявление непосредственного влияния гормона, а повышение — вторичное, его опосредованное действие. Для подтверждения этой точки зрения необходимо в первую очередь провести исследование действия  $T_3$  на активность эктоапиразы эритроцитов цыплят-бройлеров *in vitro* при добавлении его непосредственно в инкубационную среду. Кроме того, поскольку, по В. Винкельману (Winkelmann, 1963), тиреоидные гормоны в условиях *in vitro* действуют только после их предварительной инкубации с ядерными эритроцитами, то представляло интерес изучить изменения эктоапиразной активности в этих условиях.

### Материал и методика

Пробы крови одномесячных цыплят-бройлеров получали и обрабатывали по методу, описанному ранее (Куус и др., 1977).

Растворы 3,5,3'-трийод-Л-тиронина (фирмы «Реанал») приготавливали в 3,5%-ном NaCl, содержащем несколько капель 0,02 н. NaOH (конечная pH не выше 8). В опытах с добавлением гормона непосредственно в инкубационную среду концентрация  $T_3$  составляла  $1 \cdot 10^{-4}$  —  $1 \cdot 10^{-10}$  М.

Исследование влияния предварительного контакта  $T_3$  с эритроцитами проводили при температуре 23°C в течение 8, 15, 30, 60, 90 и 120 мин при концентрациях гормона  $5 \cdot 10^{-4}$  —  $5 \cdot 10^{-10}$  М. Эти концент-

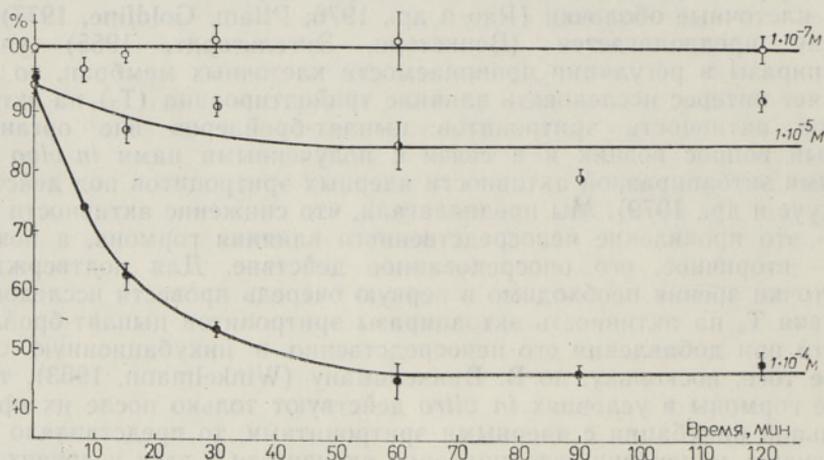
рации в ходе определения эктоапиразной активности разбавляли в 5 раз, так что концентрация  $T_3$  в инкубационной среде составляла  $1 \cdot 10^{-4}$  —  $1 \cdot 10^{-10}$  М. В состав прединкубационной среды входили 0,05 мл неповрежденных эритроцитов и 1,0 мл раствора  $T_3$ .

В обоих случаях при определении эктоапиразной активности инкубацию проводили при  $37^\circ$  в течение 30 мин, затем действовали по описанной ранее методике (Куус и др., 1977). Изменения названной активности вычисляли в процентах от соответствующих контрольных величин, которыми служили показатели эктоапиразной активности, полученные без добавления  $T_3$  в инкубационную и прединкубационную среды. Все эксперименты проводили в 2—8 повторностях. Полученные результаты обрабатывали вариационно-статистически с использованием  $t$ -критерия.

### Результаты и их обсуждение

В литературе имеются данные о том, что тиреоидные гормоны при введении животному воздействуют на многие энзимные системы, но при добавлении *in vitro* их влияние проявляется значительно реже (Гольдштейн, 1959; Баркер, 1963).

Аналогичные результаты получены и нами, а именно, в условиях *in vivo* изменения эктоапиразной активности эритроцитов цыплят-бройлеров наблюдались в зависимости от дозы гормона уже после однократной инъекции (Куус и др., 1979). Однако  $T_3$ , добавленный в концентрациях от  $1 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \cdot 10^{-10}$  М непосредственно в инкубационную среду, не влиял на изучаемую активность.



Зависимость эктоапиразной активности эритроцитов цыплят-бройлеров от продолжительности прединкубации этих клеток с  $T_3$ .

Данные опытов по использованию предварительного контакта эритроцитов с гормоном приведены на рисунке, откуда видно, что эктоапиразная активность подавлялась при двух наибольших из примененных нами концентраций  $T_3$  ( $1 \cdot 10^{-4}$  и  $1 \cdot 10^{-5}$  М) в зависимости от продолжительности прединкубации. При меньших концентрациях ( $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-9}$  и  $1 \cdot 10^{-10}$  М) активность фермента не зависела от длительности предварительной инкубации. При концентрациях трийодтиронина  $1 \cdot 10^{-4}$  и  $1 \cdot 10^{-5}$  М после 8-минутного контакта эритроцитов с гормоном сохраня-

лось соответственно 74 ( $P < 0,001$ ) и 97% ( $P > 0,05$ ) первоначальной активности, после 15-минутного контакта — 62 ( $P < 0,001$ ) и 87% ( $P < 0,001$ ). 30-минутная прединкубация обусловила уменьшение эктоапиразной активности при  $1 \cdot 10^{-4}$  М на 46% ( $P < 0,001$ ), а при  $1 \cdot 10^{-5}$  М лишь на 9% ( $P < 0,01$ ). Максимальное ингибирование (на 55%,  $P < 0,001$ ) было отмечено при наибольшей концентрации  $T_3$  после 60-минутной прединкубации, при дальнейшем увеличении длительности прединкубации изучаемая величина оставалась на этом же уровне. Все полученные изменения отличались высокой статистической достоверностью, при концентрации трийодтиронина  $1 \cdot 10^{-4}$  М в большинстве случаев  $P$  была меньше 0,001.

Приведенные данные подтверждают высказанное нами в предыдущей статье (Куус и др., 1979) предположение о первичности процессов, вызывающих снижение названной активности при введении цыплятам небольших доз  $T_3$ .

В последнее время получены данные (Rao и др., 1976; Pliam, Goldfine, 1977), показывающие значение специфических связывающих мест на плазматических мембранах изолированных клеток печени для гормонов щитовидной железы. Фиксация тиреоидных гормонов на поверхности ядерных эритроцитов утки *in vitro* в зависимости от времени изучена ранее (Roche и др., 1962). На основе сходства между данными, представленными в этих работах, и результатами, полученными нами о подавлении эктоапиразной активности эритроцитов цыплят под влиянием их прединкубации с  $T_3$ , можно предположить, что наблюдаемые в последнем случае эффекты зависят от связывания гормона на поверхности изучаемых клеток. В связи с этим предполагается, что отмеченное ингибирование является результатом прикрепления  $T_3$  к специальным рецепторам мембран эритроцитов во время их предварительного контакта с гормоном. Сохранение этого контакта в ходе 30-минутного инкубирования при определении ферментативной активности свидетельствует о прочности образовавшейся связи между  $T_3$  и поверхностью эритроцита.

Для подтверждения выдвинутой нами гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Баркер С. Б. Биохимия гормона щитовидной железы. — В кн.: Щитовидная железа. Л., 1963, 52—58.
- Венкстери Т. В., Энгельгардт В. А. Поверхностно-локализованная аденозинполифосфатаза ядерных эритроцитов. — Докл. АН СССР, 1955, 102, 133—136.
- Гольдштейн Б. И. Биохимические основы механизма действия гормонов. — В кн.: Механизм действия гормонов. Киев, 1959, 15—26.
- Куус Х., Сибуль И., Тамм А. Возрастные изменения эктоапиразной активности эритроцитов цыплят. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1977, 26, 274—278.
- Куус Х., Сибуль И., Тамм А. Влияние экзогенного трийодтиронина на эктоапиразную активность эритроцитов цыплят-бройлеров. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1979, 28, 153—157.
- Рачев Р. Р., Ещенко Н. Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М., 1975.
- Pliam, N. B., Goldfine, I. D. High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, 79, 166—172.
- Rao, G. S., Eckel, J., Rao, M. L., Breuer, H. Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 73, 98—104.
- Roche, J., Covelli, I., Macchia, V., Aloj, S. Sur la fixation des hormones thyroïdiennes par des hématies nucléées de diverses origines. — C. R. Soc. Biol., 1962, 156, 1746—1750.

Winkelmann, W. Einfluß von Schilddrüsenhormonen auf die Glucoseaufnahme und die Atmung in Vogelerythrocyten in vitro. — Z. ges. exp. Medizin, 1963, 136, 556—562.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
5/XII 1978

Helgi KUUS, Ilo SIBUL, Anna TAMM

### TIBU ERÜTROTSÜÜTIDE EKTOAPÜRAASSE AKTIIVSUSE INHIBEERIMINE TRIJOODTÜRONIINIGA EELINKUBEERIMISE TEEL

Artiklis on käsitletud trijoodtüroniini toimet tibu erütrotsüütide ektoapüraasale aktiivsusele nii tema lisamisel vahetult inkubatsioonisegusse kui ka rakkude eelneval inkubeerimisel hormooniga. Esimesel juhul ei täheldatud mingeid muutusi, teisel juhul langes ektoapüraasne aktiivsus märgatavalt, kusjuures see sõltus hormooni kontsentratsioonist ja erütrotsüütidega kokkupuute kestusest. Võib oletada, et kõnealuse inhibeerimise põhjustab trijoodtüroniini kinnitumine erütrotsüütide membraanide eriliste retseptorite külge eelinkubeerimise ajal.

Helgi KUUS, Ilo SIBUL, Anna TAMM

### INHIBITION OF ECTOAPYRASE ACTIVITY OF CHICK ERYTHROCYTES DURING THEIR PRECEDING INCUBATION WITH TRIIODOTHYRONINE

The influence of triiodothyronine ( $T_3$ ) on ectopyrase activity of chick erythrocytes was examined both by adding the hormone directly to the incubation media and after a preliminary incubation of cells with  $T_3$ . It was stated that in the first case triiodothyronine had no effect on the enzymatic activity. In the second case there was observed an inhibition of ectopyrase activity, the extent of which depended on the hormone concentration and on the duration of the contact of erythrocytes with  $T_3$ . On the grounds of experimental results it was concluded that the inhibition under discussion was a result of the binding of triiodothyronine to the specific binding sites on the membranes of erythrocytes during their preceding incubation with the hormone.