

<https://doi.org/10.3176/biol.1982.2.02>

УДК 612.42:591.147

Хельги КУУС, Анна ТАММ

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ТРИЙОДИРОНИНА НА ЭКТОАПИРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ

За последние годы достигнуты большие успехи в области изучения биологических, функциональных и биохимических особенностей лимфоцитов. Лимфоциты — это необычные, во многом уникальные клетки. Среди клеточных элементов человека и животных они обладают самым высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Лимфоциты способны к самостоятельному передвижению и могут циркулировать по всему организму, проходя многократно через лимфоидные органы и другие ткани. Лимфоциты — подвижные носители генетической информации, осуществляющие постоянный иммунологический контроль в организме, — играют ведущую роль в гуморальном и клеточном иммунитете.

Важными факторами регуляции процессов обмена веществ и функций лимфоидных органов, а также лимфоцитов являются гормональные воздействия. Особое место среди них занимают гормоны щитовидной железы, сильно влияющие на многие стороны метаболических процессов в организме. Экзогенные тиреоидные гормоны, например, вызывают изменения в активности ферментов, зависящие как от вида животного, так и от дозы гормона (Dubowitz и др., 1962; Туракулов, 1969). В литературе имеется много сведений о тесной функциональной взаимосвязи между щитовидной железой и лимфатической системой (Dougherty и др., 1962; Eickhoff, Heberhold, 1968; Месипуу и др., 1976; Айнсон, Айнсон, 1977 и др.). Плазматическая мембрана, окружающая живые клетки, имеет существенное значение в интрацеллюлярном метаболизме. От других органелл отличает эту структуру то, что она опосредует взаимодействия между клеткой и ее внешней средой. Поверхностная мембрана содержит и эктоферменты, активные центры которых направлены не в цитоплазму, а в окружающую среду. Как известно (Венкстерн, Энгельгардт, 1957; Дворкин, 1960; DePierge, Kagnovsky, 1974), поверхностно-локализованная апираза играет значительную роль в процессах проницаемости клеточных мембран и регулирует в окружающей среде содержание компонентов адениловой системы, имеющих большое значение для нормального функционирования лимфоцитов (Müller и др., 1979).

В ходе предыдущих исследований нами выяснено воздействие экзогенного трийодтиронина (T_3) на эктоапиразную активность эритроцитов цыплят (Куус и др., 1979). Выключение функции щитовидной железы и введение тиреоидных гормонов в организм отражается на различных тканях по-разному, т. е. действие названных гормонов тканеспецифично (Абдукаримов и др., 1976). Необходимо подчеркнуть, что в литературе данных о регуляции функций лейкоцитов гормонами щитовидной железы сравнительно мало. Сказанное полностью относится и к влиянию тиреоидных гормонов на метаболизм циркулирующих с лимфой лимфоцитов. Установлено наличие эктоапиразы (называемой и экто-АТФазой) на поверхности различных видов лейкоцитов, в том

числе и лимфоцитов ряда млекопитающих (Луганова и др., 1957; DePierge, Karnovsky, 1974; Smolen, Weissmann, 1978). В настоящей работе представлены материалы изучения действия однократно введенного T_3 на эктоапиразную активность лимфоцитов центральной лимфы овец.

По литературным данным (Благовещенский, 1950; Серебренникова, 1962), ферменты могут отличаться качественными особенностями, зависящими от способности уменьшать количество доставляемой извне тепловой энергии и выражающимися в сдвигах энергии активации ($E_{\text{акт.}}$) катализируемой реакции. С целью выяснения изменений энергетического барьера эктоапиразной реакции нами предпринято определение $E_{\text{акт.}}$ в норме и под влиянием тиреоидного гормона.

Материал и методика

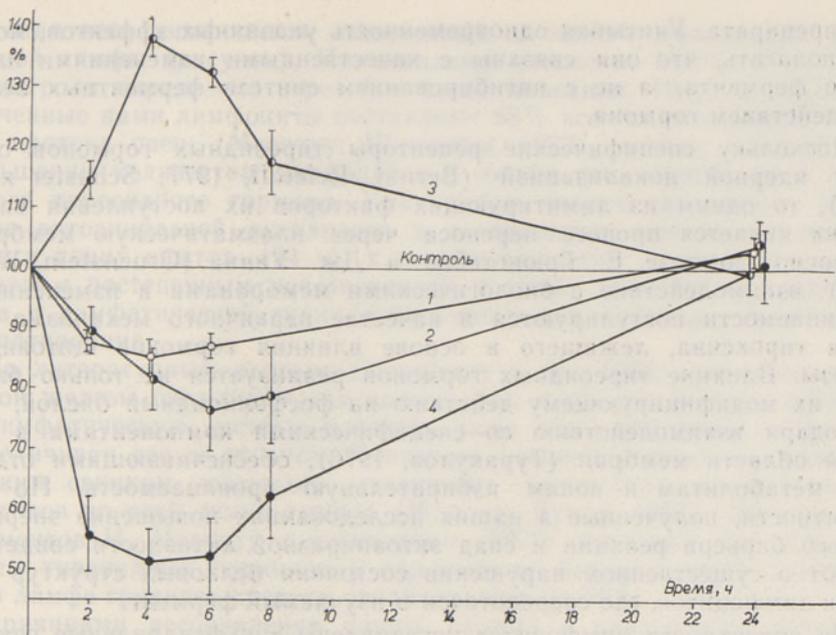
Опыты проводили на 22 двухлетних баранах эстонской темноголовой породы, у которых между грудным лимфатическим протоком и яремной веной был образован экстракорпоральный лимфо-венозный анастомоз (Mesipuu, 1971). После взятия контрольных проб животным вводили внутримышечно трийодтиронин («Берлин-Хемия», ГДР) в дозах 15 и 30 $\mu\text{кг}$ на 1 кг веса. Следующие пробы лимфы брали через 2, 4, 6, 8 и 24 ч после инъекции гормона. Лимфоциты из лимфы грудного протока выделяли центрифугированием (Месипуу, Шевченко, 1973) на рефрижераторной центрифуге ЦРЛ-1. Промытые лимфоциты взвешивали и суспендировали в трехкратном объеме физиологического раствора.

Об активности эктоапиразы лимфоцитов судили по увеличению концентрации неорганического фосфора в 0,05 мл суспензии изучаемых клеток после 30-минутной инкубации при 37° С (Куус и др., 1977). Эктоапиразную активность выражали в наномолях фосфора на 1 мг белка в минуту. Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом (Itzhaki, Gill, 1964), используя в качестве стандарта сыровоточный альбумин быка.

С целью изучения качественных свойств фермента определяли константы скоростей эктоапиразной реакции при 37 и 27°, рассчитывали температурный коэффициент Вант-Гоффа и энергию активации системы до и после введения T_3 (15 $\mu\text{кг}/\text{кг}$). Все выявленные изменения вычисляли в процентах от соответствующих контрольных величин. Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Опыты показали, что однократное парентеральное введение T_3 вызывает значительные сдвиги во всех изучаемых показателях (рисунок). Исследования эктоапиразной активности лимфоцитов выявили ее существенное снижение под влиянием T_3 по сравнению с таковой в контроле (среднее значение составляло $56,7 \pm 3,5$ $\text{нмоль P}/\text{мг}$ белка в минуту). Уже через 2 ч после введения трийодтиронина она оказалась сниженной на 12,2 ($P < 0,02$) и 10,4% ($P < 0,01$). Отмеченное уменьшение достигло максимума при меньшей дозе к 4-му часу опыта, а при двухкратном количестве препарата к 6-му часу опыта, составляя соответственно 85,3 ($P < 0,01$) и 76,5% ($P < 0,05$) от уровня контроля. В дальнейшем активность фермента проявляла тенденцию к повышению и через 24 ч после инъекции устанавливалась в обоих случаях в пределах нормы. Что касается зависимости сдвигов максимальных эффек-



Влияние однократно введенного трийодтиронина на лимфоциты овец. 1 и 2 — эктоапиразная активность (15 и 30 мкг T_3 на 1 кг веса), 3 — энергия активации эктоапиразной реакции (15 мкг T_3 на 1 кг веса), 4 — вес лимфоцитов, выделенных из 1 мл лимфы.

тов от используемой дозы T_3 , то она, по-видимому, объясняется более длительным периодом всасывания гормона при его двукратном количестве.

В контрольных опытах было определено влияние повторного взятия лимфы, необходимого для проведения анализов. Выяснилось, что в данном случае лимфопотери (3—4 раза в сутки по 50—70 мл) на активность эктоапиразы лимфоцитов существенного влияния в течение 48 ч не оказывали.

По представленным на рисунке данным видно, что энергия активации изучаемой реакции возрастает под действием трийодтиронина обратно пропорционально одновременным изменениям активности эктоапиразы и достигает максимума к 4-му часу опыта (138% по сравнению с контролем, $P < 0,05$). Исходная величина $E_{\text{акт}}$ составляла $8,524 \pm 0,162$ ккал/моль. Этот показатель повышался с повышением температуры. К концу опыта (через 24 ч после введения гормона) эти показатели возвращались к первоначальному уровню.

Гормоны щитовидной железы обладают широким спектром действия на обменные реакции клетки. Они регулируют проницаемость клеточных мембран, влияют на генетический аппарат, изменяют активность ферментов или интенсивность их синтеза (Протасова, Юдаев, 1976). Если действие тиреоидных гормонов на митохондрии проявляется почти немедленно, т. е. без латентного периода, то эффекты на уровне регуляции биосинтеза специфических белков выявляются спустя довольно длительное время (Туракулов, 1974). По сведениям литературы (Alexander, Wetzel, 1975), архитектура поверхности лимфоцитов может изменяться в ответ на модификации окружающей среды быстро и существенно. Подтверждением сказанному служат и наши результаты, выявившие сдвиги в эктоапиразной активности и изменениях энергии активации данной реакции через 2 ч после введе-

ния препарата. Учитывая одновременность указанных эффектов, можно предполагать, что они связаны с качественными изменениями изучаемого фермента, а не с ингибированием синтеза ферментных белков под действием гормона.

Поскольку специфические рецепторы тиреоидных гормонов обладают ядерной локализацией (Bernal, Refetoff, 1977; Schuster и др., 1979), то одним из лимитирующих факторов их поступления внутрь клетки является процесс переноса через плазматическую мембрану. Согласно гипотезе Е. Грюнштейна и Дж. Уинна (Gruenstein, Wynn, 1970), взаимодействие с биологическими мембранами и изменение их проницаемости постулируются в качестве первичного механизма действия тироксина, лежащего в основе влияния гормонов щитовидной железы. Влияние тиреоидных гормонов реализуется не только благодаря их модифицирующему действию на фосфолипидный бислой, но и благодаря взаимодействию со специфическими компонентами в белковой области мембран (Туракулов, 1976), обеспечивающими отдельным метаболитам и ионам избирательную проницаемость. По всей вероятности, полученные в наших исследованиях повышение энергетического барьера реакции и спад эктоапиразной активности свидетельствуют о существенном нарушении состояния белковых структур оболочки лимфоцитов, где сосредоточен и изучаемый фермент.

На поверхности лимфоцитов установлены сульфгидрильные группы, находящиеся в активных центрах эктоапиразы и повернутые наружу (Серебренникова, 1962; DePierge, Karnovsky, 1974; Козинец и др., 1975). Изучением плазматических мембран ядерных эритроцитов и изолированных клеток печени доказано важное значение связывающих мест для гормонов щитовидной железы в осуществлении их биологического действия (Roche и др., 1962; Pliam, Goldfine, 1977; Krenning и др., 1978). Восприятие же гормонов определяется реактивностью соответствующих рецепторов тех или иных органелл клетки. Исходя из вышесказанного, а также из результатов, полученных в опытах с ядерными эритроцитами (Куус и др., 1979, 1980), можно предположить, что ингибирование эктоапиразной активности лимфоцитов лимфы грудного протока является результатом связывания T_3 на поверхности изучаемых клеток. В пользу этой гипотезы говорят и данные Е. П. Креннинга с соавторами (Krenning и др., 1978), по которым система, ответственная за прикрепление трийодтиронина на плазматические мембраны, не зависит от энергообеспечения клетки. По-видимому, в белковой молекуле фермента происходит под влиянием T_3 значительная перестройка, приводящая к маскировке его активных центров и, прежде всего, SH-групп (Серебренникова, 1962). Такое преобразование затрудняет возникновение фермент-субстратных соединений, за счет чего энергетический барьер данной реакции значительно возрастает. Возможно, что именно такой род гормонального контроля может преобладать в повседневном функционировании ферментов, в то время как резкое изменение скорости синтеза без качественного сдвига свойств ферментных белков имеет особенно большое значение в процессах дифференцировки и роста тканей, а также при адаптации обмена веществ к воздействиям, имеющим характер стресса (Протасова, Юдаев, 1976).

Таким образом, можно считать, что установленное нами ингибирование эктоапиразной активности лимфоцитов центральной лимфы овец, сопровождающееся качественными изменениями фермента, является результатом непосредственного воздействия трийодтиронина и, очевидно, связано с существенным нарушением структуры белкового компонента мембран изучаемых клеток.

Под влиянием T_3 (15 мкг/кг) имеет место статистически достовер-

ный спад веса лимфоцитов, выделенных из одного миллилитра центральной лимфы (рисунок). Максимальное снижение 51,5% ($P < 0,001$) от контроля определено через 4 ч после инъекции. Имея в виду, что полученные нами лимфоциты составляют 98% всех клеток лимфы грудного протока овец (Месипуу, Шевченко, 1973), можно говорить об уменьшении количества лимфоцитов в лимфе под воздействием экзогенного тиреоидного гормона. Уменьшение энергии активации, повышение эктоапиразной активности и возвращение количества лимфоцитов к концу опытов (24 ч) к первоначальному уровню, очевидно, связаны с постепенным исчезновением к этому времени из кровяного русла и лимфатической ткани избыточного для организма количества трийодтиронина.

По литературным данным (Dougherty и др., 1962), гормоны щитовидной железы оказывают как прямое, так и опосредованное действие на лимфатическую систему в целом, чаще всего усиливая лимфопоз и увеличивая вес ее органов. Повторное введение тироксина молодым морским свинкам вызывало увеличение количества лимфатических элементов во всей ткани тимуса (Миллер, Дукор, 1967). Данные экспериментов И. Месипуу с соавторами (1976) показали, что под действием тиреоидных гормонов у подопытных баранов число лимфоцитов в лимфе грудного протока увеличилось на 20%.

Причинами несовпадения наших данных с указанными результатами могут быть видоспецифическая чувствительность животных к гормонам щитовидной железы, а также методические различия в проведении опытов. Кроме того, известно, что большие (токсические) дозы T_4 и T_3 могут вызвать эффекты, противоположные последствиям, обусловленным физиологическими количествами этих гормонов (Tata и др., 1963; Туракулов, 1969). Однонаправленность изменений эктоапиразной активности, вызванных обеими использованными в наших опытах дозами T_3 , дает повод утверждать, что введенные количества гормона были по отношению к данному ферменту физиологическими.

Маловероятно, что отмеченное быстрое снижение содержания лимфоцитов в центральной лимфе через 2 ч после введения гормона и восстановление начального уровня через 24 ч были вызваны изменениями в механизмах лимфопоза. Скорее всего, в данном случае имели место сдвиги в интенсивности миграционных процессов лимфоцитов в организме, выражающиеся во временном выведении этих клеток из циркуляции с последующим возвращением их туда после прекращения влияния экзогенного T_3 . Аналогичные изменения миграции лимфоидных клеток из селезенки в костный мозг в условиях иммобилизационного стресса мышей наблюдали П. Д. Горизонтов и его сотрудники (1980).

При оценке полученных после введения трийодтиронина результатов бросается в глаза существенное различие в объемах одновременного снижения количества лимфоцитов и их эктоапиразной активности. Следовательно, при выяснении механизмов влияния тиреоидных гормонов необходимо учитывать как их непосредственное воздействие на клеточные мембраны, так и опосредованное влияние, выражающееся в резком изменении мобилизации и перераспределения лимфоидных клеток в организме.

ЛИТЕРАТУРА

- Абдукаримов А., Мучник С. Е., Адылова А. Т., Туракулов Я. Х., Хамидов Д. Х. Регуляция дифференциальной активности генов гормонами. — В кн.: Механизм действия гормонов. Ташкент, 1976, 31—36.
Айнсон Х., Айнсон Э. О влиянии трийодтиронина на процессы лимфообразования. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1977, 26, 269—273.

- Благовещенский А. В. Количественное выражение качества ферментов. — Докл. АН СССР, 1950, 70, 65—67.
- Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А. Распространение экто-аденозинполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. — Биохимия, 1957, 22, 911—916.
- Горизонтов П. Д., Федотова М. И., Белоусова О. И., Хаитов Р. М., Черменева Л. И. Роль Т- и В-лимфоцитов в реакции кроветворной системы на стрессорное воздействие. — Бюл. эксперим. биол., 1980, LXXXIX, 415—417.
- Дворкин Г. А. Влияние ультразвуковых волн на физико-химические и ферментативные свойства поверхностных слоев эритроцитов. — В кн.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. Красноярск, 1960, вып. 1, 35—46.
- Козинец Г. И., Борзова Л. В., Кульман Р. А. Поверхностный заряд клеток крови и некоторые аспекты его биологической роли. — Лаб. дело, 1975, 5, 284—289.
- 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.
- Куус Х., Сибуль И., Тамм А. Ингибирование активности эктоапиразы эритроцитов цыплят под влиянием их предварительной инкубации с трийодтиронином. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1980, 29, 7—10.
- Луганова И. С., Сейц И. Ф., Теодорович В. И. Поверхностно-локализованная аденилпирофосфатаза в лейкоцитах. — Докл. АН СССР, 1957, 113, 149—151.
- Месипуу И. В., Тедер А. Е., Кяхрик И. А. О влиянии гормонов на обмен веществ нуклеотидов РНК лимфоцитов лимфы. — В кн.: Актуальные вопросы обмена веществ. Мат. конф. по вопр. физиологии обмена веществ в организме человека и животных. Вильнюс, 1976, 98—100.
- Месипуу И. В., Шевченко В. П. О транспорте нуклеиновых кислот лимфоцитарными клетками лимфы. — В кн.: Транспортная функция лимфы в животном организме. Таллин, 1973, 40—43.
- Миллер Дж., Дукор П. Биология тимуса. М., 1967.
- Протасова Т. Н., Юдаев Н. А. Пути гормональной регуляции активности ферментов. — В кн.: Механизм действия гормонов. Ташкент, 1976, 100—102.
- Серебrenникова И. А. Поверхностно-локализованная аденозинтрифосфатаза эритроцитов при лучевой болезни. — В кн.: Действие на организм высокоэнергетического излучения. Томск, 1962, 84—88.
- Туракулов Я. Х. Биосинтез и механизм действия гормонов щитовидной железы. — Вестн. АМН СССР, 1969, 8, 28—40.
- Туракулов Я. Х. Внутриклеточный транспорт, метаболизм и механизм действия гормонов щитовидной железы. — Третий Всесоюз. биохим. съезд. Тез. докл. Рига, 1974, 96—97.
- Туракулов Я. Х. Действие тиреоидных гормонов на метаболизм клетки. — В кн.: Механизм действия гормонов. Ташкент, 1976, 5—15.
- Alexander, E. L., Wetzel, B. Human lymphocytes: similarity of B and T cell surface morphology. — Science, 1975, 188, 732—734.
- Bernal, J., Refetoff, S. The action of thyroid hormone. — Clin. Endocrinol., 1977, 6, 227—249.
- DePierre, J. W., Karnovsky, M. L. Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocyte. II. Properties and suitability as markers for the plasma membrane. — J. Biol. Chem., 1974, 249, 7121—7129.
- Dougerthy, T. F., Berliner, M. L., Berliner, D. L. Hormonal control of lymphocyte production and destruction. — Progr. Hematol., 1962, III, 155—169.
- Dubowitz, L. M. S., Myant, N. B., Osorio, C. A comparison of the binding of thyroid hormones by rat, chicken and human serum. — J. Physiol., 1962, 162, 358—366.
- Eickhoff, W., Heberhold, C. Die Lymphbahnen der menschlichen Schilddrüse. Morphologie, Angiographie, Biochemie, Funktion. — Exptl. Med. Path. Klinik, 1968, 24, 1—111.
- Gruenstein, E., Wynn, J. A molecular mechanism of action of thyroxine: Modification of membrane phospholipid by iodine. — J. Theor. Biol., 1970, 26, 343—363.
- Itzhaki, R. F., Gill, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. — Anal. Biochem., 1964, 9, 401—410.
- Krenning, E. P., Docter, R., Bernard, H. F., Isser, T. J., Henne-mann, G. Active transport of triiodothyronine (T₃) into isolated rat liver cells. — FEBS Lett., 1978, 91, 113—116.
- Mesipuu, I. Kunstliku lümfivoenosse anastomoosi moodustamisest lammaste rinna-

- juha lümfli uurimiseks kroonilise katse abil. — ENSV TA Toim., Biol., 1971, 20, 8—10.
- Müller, M. M., Pischek, G., Scheiner, O., Stemberger, H., Wiedermann, G. Purine metabolism in human lymphocytes. — Blut, 1979, 38, 447—455.
- Pliam, N. B., Goldfine, I. D. High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 79, 166—172.
- 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.
- Schuster, L. D., Schwartz, H. L., Oppenheimer, J. H. Nuclear receptors for 3,5,3'-triiodothyronine in human liver and kidney: characterization, quantitation, and similarities to rat receptors. — J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1979, 48, 627—632.
- Smolen, J. E., Weissmann, G. Mg²⁺-ATPase as a membrane ecto-enzyme of human granulocytes. Inhibitors, activators and response to phagocytosis. — Biochim. Biophys. Acta, 1978, 512, 525—538.
- Tata, J. R., Ernster, L., Lindberg, O., Arrhenius, E., Pedersen, S., Hedman, R. The action of thyroid hormones at the cell level. — Biochem. J., 1963, 86, 408—428.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
26/V 1981

Helgi KUUS, Anna TAMM

EKSOGEENSE TRIJODTÜRONIINI MÕJU LÜMFOTSÜÜTIDE EKTOAPÜRAASSELE AKTIIVSUSELE

Artiklis on käsitletud trijodtüroniini (T₃) toimet lamba rinnajuha lümfli lümfotsüütide ektoapüraassele aktiivsusele 2, 4, 6, 8 ja 24 tundi pärast hormooni ühekordset manustamist (15 ja 30 µg kehakaalu 1 kg kohta). Tulemustest ilmneb T₃ osa nimetatud ensüümi aktiivsuse reguleerijana. Oletatakse, et hormooni doosist olenevas ektoapüraasi aktiivsuse pärssimises, millega kaasneb fermenti kvalitatiivsete omaduste muutumine, avaldub T₃ vahetu toime rakumembraanide valgulisele osale. Lümfotsüütide hulga samaregset järsku langust (kontrollprooviga võrreldes maksimaalselt 52%) võib seletada T₃ vahendatud efektide kaudu, mis väljenduvad lümfoidsete rakkude mobilisatsiooni ja ümberpaigutuse mehhanismi muutuses.

Helgi KUUS, Anna TAMM

EFFECT OF EXOGENOUS TRIIODOTHYRONINE ON THE ECTOAPYRASE ACTIVITY OF LYMPHOCYTES

The action of triiodothyronine (T₃) on the ectoapyrase activity of sheep thoracic duct lymph lymphocytes was studied 2, 4, 6, 8 and 24 hours after subcutaneous injection of the hormone in doses of 15 and 30 µg per kg of body weight. Results show that T₃ takes part in the regulation of the enzymatic activity under discussion. It is concluded that the inhibition of ectoapyrase activity that depends on the dose of hormone and accompanies the qualitative changes of the enzyme, is the result of a direct influence of T₃ on the protein component of the cell membranes. A simultaneous precipitous fall in the quantity of lymphocytes (maximally 52% in comparison with the control values) may be explained as a secondary appearance of the hormonal effects. Probably they are expressed by a change in the mechanisms of mobilization and rearrangement of lymphatic cells in the organism after an injection of T₃.