

УДК 577.152.313

Хельги КУУС, Тоомас КЕЭП, Анна ТАММ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭКТО-АТФазной АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ЭРИТРОЦИТОВ

Данные о ферменте внешней стороны плазматической мембраны (экто-АТФаза) появились в литературе после его обнаружения на клетках асцитной карциномы Эрлиха в 1954 году (Ас и др., 1954). Выявление этого фермента у многих видов клеток организма позволяет полагать, что экто-АТФазная активность является общим свойством эукариотных клеток (Pommier и др., 1975; Yoshimura и др., 1983). Известно, что активность данного фермента подавляется сульфгидрильными ядами и соединениями йода, но является исключительно устойчивой при действии таких деструктивных факторов, как липаза, трипсин, папаин, ионизирующая радиация и перекисное окисление липидов (Smolen, Weissmann, 1978; Меерсон и др., 1983; Куус и др., 1989). При этом отмечается, что биологическое значение экто-АТФазы остается невыясненным.

Влияние внешнего сигнала на плазматические мембраны интенсивно исследуется в клетках кровеносной и лимфоидной систем, у отдельных популяций которых выявлены существенные различия в экспонировании рецепторов и ферментативной активности их поверхности (Salem и др., 1981; Manegu и др., 1984). В то же время сравнительные данные об экто-АТФазной активности этих клеток до сих пор практически отсутствуют. В настоящей работе ставилась цель исследовать активность названного фермента в клетках некоторых лимфоидных органов и в эритроцитах в норме, а также под влиянием альдегидов, ненасыщенных жирных кислот и интенсификации в клетках свободнорадикальных реакций.

Методика

В опытах использовали изолированные клетки тимуса, бursы Фабриция и эритроциты двухмесячных цыплят-бройлеров. Выделение лимфоидных клеток из органов и приготовление их суспензий описаны ранее (Куус и др., 1989). Концентрации клеток в суспензиях определяли методом их подсчета в камере Горяева. Жизнеспособность исследуемых клеток оценивали по состоянию плазматической мембраны при обработке трипановым синим. При этом число окрашенных интактных клеток не превышало 15%.

Активирование свободнорадикального окисления в изучаемых клетках проводили гамма-облучением ^{60}Co на установке «Луч-1» дозами 200 и 400 Гр при мощности дозы 1,79 Гр/мин, а также в присутствии 10^{-4} — 10^{-1} М перекиси водорода. Определение экто-АТФазной активности клеток проводили по приросту неорганического фосфора в ферментативной реакции по методу Лоури и Лопеса в модификации В. П. Скулачева (Никулина, 1965).

Перед определением ферментативной активности клетки в течение 15 мин выдерживали при 20°C в среде с перекисью водорода и карбонильными соединениями (ацетон, ацетальдегид, энантовый и глутаро-

вый альдегид) в концентрациях 10^{-6} — 10^{-1} М и ненасыщенными жирными кислотами (олеиновая, линолевая и окисленная линолевая) в концентрациях 10^{-4} — 10^{-3} М. Окисление линолевой кислоты проводили в течение 24 ч при 60 °С и свободном доступе кислорода воздуха, а в дальнейшем ходе опыта ее выдерживали в темноте при комнатной температуре. С целью установления степени окисления линолевой кислоты определяли йодометрически наличие перекисей (Антоновский, Бузланова, 1978) и спектрофотометрически (430 нм) с помощью динитрофенилгидразина (Какáč, Vejdělek, 1974) — концентрацию карбонильных соединений в ней. Установлено, что их содержание в окисленной линолевой кислоте соответственно в 22 и 268 раз превышало эти показатели в неокисленной жирной кислоте.

Результаты и обсуждение

Установленная в экспериментах экто-АТФазная активность интактных клеток бурсы Фабриция, тимоцитов и эритроцитов составляла соответственно $0,97 \pm 0,06$, $1,33 \pm 0,08$ и $0,21 \pm 0,02$ нмоль неорганического фосфора на 10^6 клеток в минуту.

Выяснено, что интенсификация в изучаемых клетках свободно-радикальных процессов не влияет или оказывает слабое действие на изучаемый фермент. Так, при облучении тимоцитов и клеток бурсы сравнительно высокими дозами гамма-радиации не удалось обнаружить достоверного изменения активности экто-АТФазы (табл. 1). Устойчивость эктофермента относительно свободнорадикальных процессов выявляется и при выдерживании клеток в среде с перекисью водорода (табл. 2). Под действием H_2O_2 активность экто-АТФазы в тимоцитах и эритроцитах не

Таблица 1

Экто-АТФазная активность клеток под воздействием γ -радиации

Доза излучения, Гр	Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция	
	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %
0	8	100	15	100
200	4	99,6	7	110,6
400	4	91,0	9	89,2

Таблица 2

Влияние перекиси водорода на экто-АТФазную активность клеток

Концентрация H_2O_2 , М	Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция		Эритроциты	
	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %
0	19	100	18	100	14	100
$1 \cdot 10^{-4}$	2	95,5	2	111,5	4	95,4
$1 \cdot 10^{-3}$	6	106,6	6	100,2	6	100,1
$1 \cdot 10^{-2}$	7	96,0	6	118,4*	8	102,0
$1 \cdot 10^{-1}$	7	90,0	6	127,1*	6	101,4

* $P < 0,05$.

изменяется, в клетках бурсы Фабриция наблюдается некоторая стимуляция при концентрациях перекиси порядка 10 мМ и выше. Полученные результаты согласуются со сведениями Ф. З. Меерсона и др. (1983), установивших, что активирование в мембранах свободнорадикальных процессов не затрагивает активности Mg^{2+} -АТФазы везикул сарколеммы сердца.

Известно, что функциональная активность клеток и их мембран нарушается альдегидами (Schauenstein и др., 1977). Нами исследовалось действие на экто-АТФазу ацетальдегида, который ввиду гидрофильности связывается в поверхностные структуры мембран, энантового альдегида, проникающего в гидрофобную область мембран, а также глутарового диальдегида. Из табл. 3 видно, что моноальдегиды, независимо от их локализации в мембранах, не вызывают изменения экто-АТФазной активности. Диальдегид в пределах концентрации 1—10 мМ (табл. 4) вызывает стимуляцию фермента у всех видов клеток. При более высокой концентрации глутарового альдегида наблюдается снижение изучаемой активности, что, по всей вероятности, вызвано полимеризацией фермента.

Таблица 3

Экто-АТФазная активность лимфоидных клеток под воздействием ацетальдегида и энантового альдегида

Концентрация реагента, М	Ацетальдегид				Энантовый альдегид			
	Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция		Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция	
	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %
0	5	100	3	100	5	100	3	100
$1 \cdot 10^{-6}$	2	95,5	2	107,1	—	—	—	—
$1 \cdot 10^{-5}$	2	94,6	2	90,9	—	—	—	—
$1 \cdot 10^{-4}$	5	81,9	2	97,4	5	82,1	2	106,4
$1 \cdot 10^{-3}$	2	97,9	2	100,7	3	106,7	3	85,1
$1 \cdot 10^{-2}$	2	96,7	3	99,4	2	143,3	3	112,5
$1 \cdot 10^{-1}$	—	—	3	99,6	—	—	3	96,2

Таблица 4

Экто-АТФазная активность клеток под действием глутарового альдегида

Концентрация реагента, М	Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция		Эритроциты	
	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %
0	15	100	13	100	10	100
$1 \cdot 10^{-6}$	3	94,5	2	104,4	—	—
$1 \cdot 10^{-5}$	3	93,7	2	116,8	—	—
$1 \cdot 10^{-4}$	7	98,1	2	98,0	2	82,7
$1 \cdot 10^{-3}$	6	115,1*	2	116,4	3	89,0
$1 \cdot 10^{-2}$	12	155,4*	6	137,5*	7	114,4*
$1 \cdot 10^{-1}$	9	55,7*	10	35,5*	10	28,8*

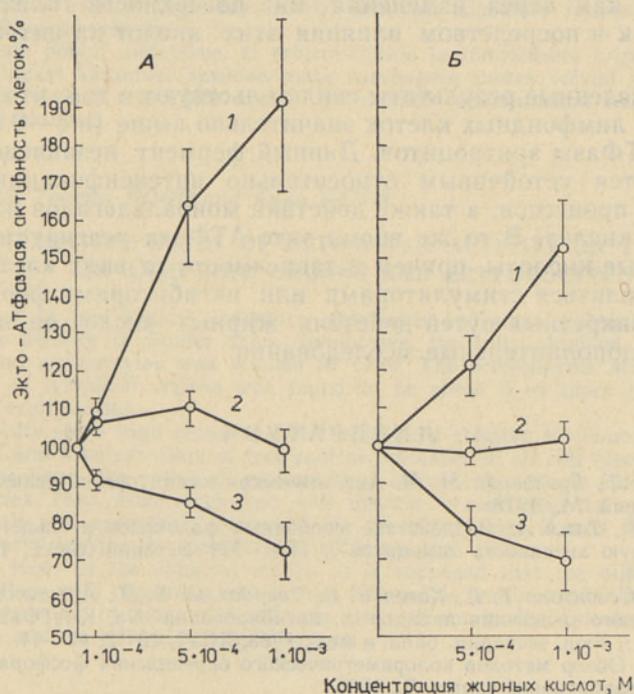
* $P < 0,05$.

Влияние окисления линолевой кислоты на лимфоидные клетки

Концентрация окисленной линолевой кислоты, М	Тимоциты		Клетки бурсы Фабриция	
	Число опытов	Активность фермента, %	Число опытов	Активность фермента, %
0	10	100	10	100
$1 \cdot 10^{-4}$	4	108,9	4	106,6
$5 \cdot 10^{-4}$	4	100,3	4	93,9
$1 \cdot 10^{-3}$	4	99,1	4	106,9

В клеточных мембранах происходит постоянное медленное окисление жирнокислотных ацилов. Конечными продуктами этого процесса являются различные карбонильные соединения, часть из которых отличается высокой токсичностью. Ранее нами было показано, что окисление мембранных липидов не влияет на экто-АТФазную активность (Куус и др., 1989). Исследование воздействия на фермент экзогенной окисленной линолевой кислоты (табл. 5), которая содержит соединения, аналогичные с накапливающимися в мембранах при окислении эндогенных липидов, свидетельствует о том, что поверхностная АТФаза является резистентной по отношению к этому реагенту.

Неокисленные жирные кислоты, в отличие от окисленных, вызывают существенное изменение активности фермента (рисунок), выявляющееся при концентрациях 0,1—1,0 мМ и зависящее от типа клеток. В клетках бурсы Фабриция при воздействии линолевой кислоты активность экто-АТФазы возрастает (максимально примерно двукратно), в тимоцитах



Влияние линолевой (А) и олеиновой (Б) кислот на экто-АТФазную активность клеток бурсы Фабриция (1), тимоцитов (2) и эритроцитов (3) цыплят.

практически не изменяется, а в эритроцитах ингибируется (приблизительно на 30%). Аналогичным, хотя несколько менее выраженным действием обладает неокисленная олеиновая кислота. При проверке инкубированных с жирными кислотами клеток на жизнеспособность с помощью трипанового синего наблюдалось практически 100%-ное окрашивание. Следовательно, неокисленные жирные кислоты в используемых нами концентрациях вызывают повреждение плазматической мембраны. На основе этого можно было бы предположить, что нарушение целостности внешней мембраны вызывает изменение активности эктофермента. Однако, как показано в опытах с тимоцитами и лимфоцитами селезенки (Pommier и др., 1975), повреждение плазматической мембраны не изменяет их экто-АТФазной активности. Кроме того, если полагать, что деструктивное действие жирных кислот является причиной наблюдаемого нами изменения активности экто-АТФазы, то неясной остается различная реакция изучаемого фермента у разных популяций клеток. Это явление, по-видимому, объяснимо специфичностью плазматических мембран, которые у клеток лимфоидной ткани и эритроцитов резко различаются как по функциональной активности, так и по физико-химическим свойствам. Наряду с этим, активность экто-АТФазы может зависеть от внутриклеточных немембранных структур (Smolen, Weissmann, 1978). Так, например, при перестройке цитоскелетной системы изменяется активность экто-АТФазы (Pommier и др., 1975). Отмечается также (Smolen, Weissmann, 1978) сходство между кинетическими характеристиками названного фермента с миозиновой АТФазой, являющейся одним из компонентов цитоскелета клетки. Поэтому не исключено, что значительные различия внутриклеточных структур эритроцитов и клеток лимфоидной ткани (Фултон, 1987) могут являться одной из причин различного действия свободных жирных кислот на эктофермент изучаемых клеток. Следовательно, разная реакция экто-АТФазы на неокисленные жирные кислоты в отдельных популяциях клеток может быть опосредована как через изменения на поверхности плазматической мембраны, так и посредством влияния этих кислот на цитоскелетную систему.

Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что активность экто-АТФазы лимфоидных клеток значительно выше (в 5—6 раз) активности экто-АТФазы эритроцитов. Данный фермент независимо от типа клеток является устойчивым относительно интенсификации свободно-радикальных процессов, а также действия моноальдегидов или окисленных жирных кислот. В то же время экто-АТФаза реагирует на неокисленные жирные кислоты, причем в зависимости от вида клеток эти кислоты могут являться стимуляторами или ингибиторами фермента. Для выяснения конкретных путей действия жирных кислот на эктофермент необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Антоновский В. Л., Бузланова М. М. Аналитическая химия органических пероксидных соединений. М., 1978.
- Куус Х., Кёэн Т., Тамм А. Воздействие свободных радикалов и альдегидов на экто-АТФазную активность тимоцитов // Изв. АН Эстонии. Биол., 1989, 38, № 3, 180—184.
- Меерсон Ф. З., Сазонтова Т. Г., Каган В. Е., Твердохлиб В. П., Архипенко Ю. В. Роль перекисного окисления липидов в ингибировании Na, K-АТФазы сердца при стрессе // Бюл. эксперим. биол. и мед., 1983, XCVI, № 12, 42—44.
- Никулина Г. Н. Обзор методов колориметрического определения фосфора по образованию «молибденовой сини». Л., 1965.
- Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М., 1987.
- Acs, G., Ostrowski, W., Straub, F. B. Über die Adenylpyrophosphatase-Aktivität an der Oberfläche der Aszites-Krebszellen // Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1954, VI, N 2—3, 261—263.

- Kakáč, B., Vejdělek, Z. J. Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen. Prague, 1974.
- Manery, J. P., Dryden, E. E., Still, J. S., Madapallimattam, G. Characteristics of skeletal muscle ecto-ATPase *in situ* // Can. J. Biochem. Cell. Biol., 1984, 62, N 10, 1015—1026.
- Pommier, G., Ripert, G., Azoulay, E., Depieds, R. Effect of concanavalin A on membrane-bound enzymes from mouse lymphocytes // Biochim. Biophys. Acta, 1975, 389, N 3, 483—494.
- Salem, N., Lauter, C. J., Trams, E. G. Selective chemical modification of plasma membrane ectoenzymes // Biochim. Biophys. Acta, 1981, 641, N 2, 366—376.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H., Zollner, H. Aldehydes in Biological Systems. London, 1977.
- 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, N 3, 525—538.
- Yoshimura, Y., Nishida, M., Kawada, J. An ecto-ATPase of thyroidal cell membrane // Endocrinol. japon. 1983, 30, N 6, 769—775.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
15/VI 1989

Helgi KUUS, Toomas KÕOP, Anna TAMM

LUMFOIDSETE ORGANITE RAKKUDE JA ERÜTROTSÜÜTIDE EKTO-ATPaasse AKTIIVSUSE KÕRVUTAV UURIMINE

Võrreldi tibu tümotsüütide, Fabriciuse bursa rakkude ja erütrotsüütide ekto-ATPaasse aktiivsuse muutusi vabade radikaalide induktorite, aldehüüdide ja küllastamata rasvhapete mõjul. Kõnealuse fermenti aktiivsus lümfoidsete organite intaktsete rakkude puhul osutus 5—6 korda kõrgemaks kui erütrotsüütide korral. Kõikidel uuritavatel rakuliikidel ilmnis ekto-ATPaasi suur resistentsus nii monoaldehüüdide, oksüdeeritud oleiinhappe kui ka vabade radikaalidega seotud protsesside intensiivistumise suhtes. Oksüdeerimata rasvhapped seevastu kutsusid esile rakutüübist sõltuvalt kõnealuse fermenti märgatava inhibeerimise või aktiveerimise.

Tulemuse põhjal oletatakse, et erütrotsüütide ja lümfoidsete organite rakkude ekto-ATPaasi erinevat käitumist oksüdeerimata rasvhapete suhtes võivad põhjustada plasma-membraanide ehituse erinevuste kõrval ka olulised lahkuminekid nende rakkude tsütoskelettide struktuuris.

Helgi KUUS, Toomas KÕOP and Anna TAMM

COMPARATIVE STUDY OF EKTO-ATPase ACTIVITY ON THE CELLS OF LYMPHOID ORGANS AND ERYTHROCYTES

The effect of free radical inductors, aldehydes and unsaturated fatty acids on the ecto-ATPase activity of broiler chick thymocytes, the cells obtained from the bursa of Fabricius and erythrocytes was studied *in vitro*. The ecto-enzyme activity measured on intact cells of lymphoid organs was found to be about 5—6 times higher than on the occasion of erythrocytes.

The results show high resistance of the ferment relative to monoaldehydes, oxidized linoleic acid and intensification of free radical processes in all cell types under discussion. On the other hand, the action of non-oxidized fatty acids became evident in dependence on cell species. Thus, after incubation with linoleic or oleic acid the ecto-ATPase activity of bursa cells was essentially activated, on the thymocytes it was not affected, but in the case of erythrocytes the considerable inhibition took place.

On the basis of the obtained results it is supposed that the different behaviour of the ecto-ATPase with regard to nonoxidized fatty acids can be explained by the differences in the construction of plasma membranes as well as in the cytoskeletal structures of erythrocytes and the cells of lymphoid organs.