

ВОЗДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ И АЛЬДЕГИДОВ НА ЭКТО-АТФАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ

В последние годы внимание биохимиков и биологов привлекают мембранные эктоферменты, активные центры которых направлены не в цитоплазму, а в окружающую ее среду, в связи с чем они являются первой мишенью при воздействии на клетку инородными агентами. К числу таких ферментов относится и экто-АТФаза (экто-апираза), действие которой заключается в расщеплении внеклеточного АТФ до АМФ. Поскольку физиологический смысл экто-АТФазы до настоящего времени остается неясным, то представляло интерес выяснить, не заключается ли ее роль в опосредовании воздействия на клетку соединений, возникающих в организме при воспалительных процессах. Согласно современным представлениям, при воспалении в тканях активируются свободнорадикальные процессы, возрастает концентрация альдегидов и кетонов, накапливаются продукты перекисного окисления липидов и т. д. (McCord, Fridovich, 1978; Kraut, Sagone, 1981), что оказывает на функции биомембран самое разнообразное действие. В связи с этим нами исследовалось *in vitro* изменение активности экто-АТФазы тимоцитов под действием инициаторов свободных радикалов — гамма-облучения, ионов двухвалентного железа и перекиси водорода, а также карбонильных соединений как конечных продуктов перекисного окисления липидов.

Методика

Работу выполняли на изолированных тимоцитах 25 двухмесячных цыплят-бройлеров. Освобожденный от соединительной и жировой ткани тимус помещали в холодный физиологический раствор и измельчали в гомогенизаторе. Гомогенат выдерживали в течение 1 ч при температуре 0—4 °С и фильтровали. Тимоциты очищали градиентным центрифугированием в растворе верографина ($d=1,076$) и суспендировали в физиологическом растворе (Пыдер и др., 1988). Концентрацию тимоцитов в их суспензиях подсчитывали в камере Горяева.

Свободнорадикальное окисление активировали в тимоцитах гамма-облучением ^{60}Co на установке «Луч-1» дозами 100, 200 и 400 Гр при мощности дозы 2,1 Гр/мин с последующей инкубацией суспензии в течение 30 мин в присутствии 12 мкМ FeSO_4 и 0,8 мМ аскорбиновой кислоты, а также инкубацией необлученных тимоцитов в присутствии 10^{-4} — 10^{-1} М перекиси водорода.

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов оценивали по накоплению в суспензиях малонового диальдегида, дающего окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой (Wilbur и др., 1949). Ацетон, ацетальдегид, энантивый и глутаровый альдегид добавляли к необлученным суспензиям в концентрациях 10^{-6} — 10^{-1} М.

Активность экто-АТФазы исследуемых тимоцитов определяли по ранее описанной методике (Куус, Тамм, 1982), белок — по методу О. Г. Лоури (Lowry и др., 1951). Изменения указанной активности вычисляли в процентах от соответствующих контрольных величин и обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

Индукция в суспензии тимоцитов свободных радикалов разными дозами гамма-облучения и ионами железа обуславливала снижение активности экто-АТФазы лишь при дозе 400 Гр, а также при той же дозе с последующим инкубированием с добавлением ионов железа и аскорбинской кислоты (табл. 1). Небольшое повышение изучаемой активности наблюдалось при инкубировании необлученных тимоцитов в присутствии ионов железа. При меньших дозах радиации, как без ионов железа, так и с их добавлением экто-АТФазная активность существенно не изменялась. При инкубировании клеток в присутствии 0,1 М перекиси водорода отмечено ингибирование активности фермента, а ее более низкие концентрации достоверного влияния не оказывали (табл. 2). Полученные данные указывают на малую чувствительность изучаемого фермента к процессам свободнорадикального окисления, вызываемым в мембранах тимоцитов гамма-радиацией, ионами железа и перекисью водорода.

Таблица 1

Влияние γ -радиации и ионов железа (12 мкМ) на экто-АТФазную активность тимоцитов

Вид воздействия	Число опытов	Образовавшийся МДА, нмоль/мг белка	Активность экто-АТФазы, % от контроля
0 Гр	15	0,10	100
100 Гр	6	0,11	99,5
200 Гр	5	0,14	92,5
400 Гр	7	0,20	89,3*
Fe ²⁺	5	0,61	109,9*
100 Гр+Fe ²⁺	5	0,46	98,2
200 Гр+Fe ²⁺	5	0,50	98,2
400 Гр+Fe ²⁺	4	0,50	97,8
400 Гр+Fe ²⁺ +аск. к-та	4	0,50	92,9*

Примечание. Здесь и в табл. 2 среднее значение активности экто-АТФазы интактных тимоцитов составляло $1,20 \pm 0,08$ нмоль P/10⁶ клеток · мин, которое принимали за 100%.

* $P \leq 0,05$.

Таблица 2

Изменение экто-АТФазной активности тимоцитов при воздействии на них перекиси водорода, ацетона и глутарового альдегида

Концентрация реагента, М	Перекись водорода		Ацетон		Глутаровый альдегид	
	Число опытов	Активность экто-АТФазы, % от контроля	Число опытов	Активность экто-АТФазы, % от контроля	Число опытов	Активность экто-АТФазы, % от контроля
10 ⁻⁶	—	—	2	79,9*	3	94,5
10 ⁻⁵	—	—	2	88,4	3	93,7
10 ⁻⁴	2	95,5	6	91,3	7	93,6
10 ⁻³	6	106,6	2	96,1	6	115,1*
10 ⁻²	9	101,2	2	98,0	12	155,4*
10 ⁻¹	8	86,2*	—	—	9	55,7*

Для проявления ферментативной активности экто-АТФазе, подобно другим фосфогидролазам, необходимо наличие свободных SH-групп (Herbert, 1956; Chan, Rosenblum, 1969; DePierre, Karnovsky, 1974; Yoshimura и др., 1983; Manegy и др., 1984). В отношении стабильности SH-функциональных ферментов существенное значение имеет их расположение в мембране. При воздействии окислителей, имеющихся во внеклеточной среде, сульфгидрильные группы поверхностных ферментов могут находиться в стабилизированном окисленном состоянии уже в интактных клетках (Мецлер, 1980). На основании вышесказанного нами предполагается, что выявленная резистентность экто-АТФазы относительно действия свободных радикалов в тимоцитах может быть обусловлена предварительным окислением большинства сульфгидрильных групп названного фермента. Это предположение поясняют и полученные Г. К. Герасимовой и З. Н. Нахильницкой (1973) результаты, по которым облучение не затрагивает существенным образом SH-групп белков, локализованных на поверхности мембран.

Среди используемых карбонильных соединений самым эффективным оказался глутаровый альдегид (табл. 2), который, начиная с 10^{-3} М, вызывал увеличение активности фермента, причем максимальное повышение на 55% с большой статистической достоверностью наблюдалось при концентрации альдегида 10^{-2} М. При 10^{-1} М отмечалось двукратное снижение изучаемой активности. Такие карбонильные соединения, как ацетон, ацетальдегид и энантивый альдегид не оказывали существенного влияния на экто-АТФазную активность тимоцитов.

Поскольку альдегиды могут выступать в роли восстановителей (Schauenstein и др., 1977), то весьма вероятно, что причиной указанного повышения экто-АТФазной активности под влиянием глутарового альдегида в концентрации 10^{-3} — 10^{-2} М можно считать освобождение дополнительных сульфгидрильных групп в молекуле фермента.

Что касается ингибирования экто-АТФазы глутаровым альдегидом в концентрации 10^{-1} М, то следует учесть, что одним из наиболее характерных свойств этого альдегида является способность образовывать при высоких концентрациях поперечные связи с белками легче, чем другие альдегиды. Вследствие этого он широко используется как фиксатор при исследованиях биологических структур (Habeeb, Hiromoto, 1968; Morel и др., 1971; Renau-Piqueras и др., 1981). Отмечено ингибирование АТФазы, АДФазы и АМФазы в плазматических мембранах митохондрий и микросом печени крыс после обработки клеток глутаровым альдегидом (Schauenstein и др., 1977). В. Е. Каган с соавторами (1982) доказал, что инкубация суспензии везикул саркоплазматического ретикулула с названным альдегидом приводит к образованию полимерных продуктов с одновременным ингибированием Ca^{2+} -АТФазы. По аналогии с вышеприведенными данными можно предположить, что причиной полученной нами пониженной активности экто-АТФазы (табл. 2), по всей вероятности, также является полимеризация фермента под влиянием глутарового альдегида в концентрации 10^{-1} М.

Отсутствие влияния на исследуемый фермент ацетальдегида и энантивого альдегида можно объяснить их физическими свойствами: ацетальдегид ввиду высокой степени гидрофильности не проникает до активного центра фермента, а гидрофобный энантивый альдегид погружается в мембранах, в первую очередь, в гидрофобную область липидного бислоя.

Хотя характерной чертой многих фосфогидролаз является их липидозависимость, по нашим результатам экто-АТФазу следует отнести к числу независящих от липидов ферментов. Об этом свидетельствует отсутствие влияния на активность фермента свободнорадикального

окисления липидов (табл. 1, 2), в ходе которого, как известно, в жирно-кислотных ацилах происходят интенсивные деструктивные процессы, существенно изменяющие химический состав и физические свойства липидного бислоя. На независимость экто-АТФазной активности от липидов указывают и данные Дж. Смолена и Дж. Уайсмманна (Smolen, Weissmann, 1978), согласно которым обработка гранулоцитов человека липазами не приводит к изменению активности их поверхностно-локализованной Mg^{2+} -АТФазы.

Таким образом можно считать, что являясь относительно устойчивым ферментом в условиях действия на клетку индукторов свободно-радикального окисления, а также карбонильных соединений в высоких концентрациях, экто-АТФаза не принимает непосредственного участия в опосредовании развития в организме воспалительных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

- Герасимова Г. К., Нахильницкая З. Н. Роль сульфгидрильных групп в радиационном повреждении транспортной функции мембран эритроцитов // Действие ионизирующего излучения на клеточные мембраны. М., 1973, 51—57.
- Казан В. Е., Архипенко Ю. В., Козлов Ю. П. Ca^{2+} -АТФаза при перекисном окислении липидов в саркоплазматическом ретикулуме // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982, 50—59.
- Куус Х., Тамм А. Влияние экзогенного трийодтиронина на эктоапиразную активность лимфоцитов // Изв. АН ЭССР. Биол., 1982, 31, № 2, 79—85.
- Мецлер Д. Химические реакции в живой клетке. I. М., 1980.
- Пыдер О., Куус Х., Тамм А., Тедер А. Влияние верографина и глутарового альдегида на поверхностные свойства лимфоцитов овец // Изв. АН ЭССР. Биол., 1988, 37, № 2, 114—120.
- Chan, P. C., Rosenblum, M. Effect of sulfhydryl group modification on erythrocyte membrane adenosine triphosphatase // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1969, 130, N 1, 143—145.
- 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, N 22, 7121—7129.
- Habeeb, A. F., Hiromoto, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde // Arch. Biochem. Biophys., 1968, 126, N 1, 16—26.
- Herbert, E. A study of the liberation of orthophosphate from adenosine triphosphate by the stromata of human erythrocyte // J. Cell. Comp. Physiol., 1956, 47, N 1, 11—36.
- Kraut, E. H., Sagone, A. L. The effect of oxidant injury on the lymphocyte membrane and functions // J. Lab. Clin. Med., 1981, 98, N 5, 697—703.
- Manery, J. P., Dryden, E. E., Still, J. S., Madapallimattam, G. Characteristics of skeletal muscle ecto-ATPase in situ // Can. J. Biochem., 1984, 62, N 10, 1015—1026.
- McCord, J. M., Fridovich, I. The biology and pathology of oxygen radicals // Ann. Intern. Med., 1978, 89, N 1, 122—127.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem., 1951, 193, 265—275.
- Morel, F. M. M., Baker, R. F., Wayland, H. Quantitation of human red blood cell fixation by glutaraldehyde // J. Cell. Biol., 1971, 48, N 1, 91—100.
- Renau-Piqueras, J., Knecht, E., Hernandez-Yago, J. Effects of different fixative solutions on labeling of concanavalin-A receptor sites in human T-lymphocytes // Histochem. J. 1981, 71, 559—565.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H., Zollner, H. Aldehydes in Biological Systems. London, 1977.
- Smolen, J. E., Weissmann, G. Mg^{2+} -ATPase as a membrane ecto-enzyme of human granulocytes. Inhibitors, activators and response to phagocytosis // Biochim. Biophys. Acta, 1978, 512, N 3, 525—538.
- Wilbur, K. M., Bernheim, F., Shapiro, O. W. The thiobarbituric acid as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids // Arch. Biochem. Biophys., 1949, 24, N 2, 305—313.
- Yoshimura, Y., Nishida, M., Kawada, J. An ecto-ATPase of thyroidal cell membrane // Endocrinol. Jpn., 1983, 30, N 6, 769—775.

VABADE RADIKAALIDE JA ALDEHUÜDIDE MOJU TÜMOTSÜÜTIDE EKTO-ATPaasi AKTIIVSUSELE

Uuriti tibu tümotsüütide ekto-ATPaasi (ektoapüraasi) aktiivsuse muutusi vabade radikaalide induktoirite (γ -kiirgus, Fe^{2+} , vesinikperoksiid) ja karbonüülühendite mõjul. Uuringute alusel oletati, et ekto-ATPaasi ilmenenud resistentsus membraani lipiidide vaba radikaalse oksüdatsiooni suhtes on tingitud enamiku selle fermenti sulfhüdrüülrühmade eelnevast stabiliseerumisest.

Kasutatud karbonüül derivaatidest osutus kõige efektiivsemaks glutaaraldehüüd; atsetoon, atseetaldehüüd ja õnantaldehüüd ei mõjutanud neis tingimustes tümotsüütide ekto-ATPaaset aktiivsust. Tulemuste põhjal on järeldatud, et tümotsüütide ekto-ATPaas on lipiididest sõltumatu ferment, mis ei osale vahetult rakkude tegevuses organismi põletikuliste protsesside korral.

ECTO-ATPase ACTIVITY OF THYMOCYTES AFFECTED BY FREE RADICALS AND ALDEHYDES

The ecto-ATPase (ectoapyrase) is an ATP phosphohydrolase located on the external surface of the cell plasma membrane. However, the functional significance of ecto-ATPase has not been clarified. In the case of inflammation in tissues, the increased amounts of free radicals, carbonyl derivatives and other products of lipid peroxidation are shown. In order to elucidate whether the observed enzyme is connected with inflammatory processes or not, the effect of free radicals and carbonyl derivatives on the ecto-ATPase activity of broiler chick thymocytes was examined *in vitro*.

The results show low sensitivity of the ferment relative to lipid peroxidation initiated by γ -radiation (100, 200 and 400 Gy), Fe^{2+} (12 μM) and hydrogen peroxide (10^{-4} — 10^{-1} M). The intensiveness of free radical oxydation processes in the plasma membranes of isolated thymocytes was evaluated by the malondialdehyde accumulation in suspensions. Since thiol groups of the enzyme are essential for its activity it is supposed that the appeared resistance of the ecto-ATPase with respect to the damage of free radical oxydation is caused by the previous stabilization of most sulphydryls in the membrane surface proteins.

Among the used carbonyl derivatives the most effective was glutaraldehyde while acetone, acetaldehyde and oenanthal at concentrations interval of 10^{-6} — 10^{-1} M had practically no influence. The rise in the enzyme activity caused by glutaraldehyde at 10^{-3} — 10^{-2} M is motivated by liberation of additional SH-groups upon the action of glutaraldehyde as a reducing agent. On the other hand, the obtained decrease in the ecto-enzyme activity can be explained by the polymerization of the ferment with 10^{-1} M glutaraldehyde.

On the basis of the information presented it is concluded that the ecto-ATPase of thymocyte membranes does not require lipids for its correct functioning and probably does not take part in the mediation inflammatory processes in the organism.