

УДК 612.42:591.147

Хельги КУУС,* Анна ТАММ*

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТРИЙОДИТРОНИНА НА ЭКТОФЕРМЕНТЫ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

Эктоферменты, располагаясь на внешней стороне плазматических мембран, направлены своими активными центрами в окружающую среду, в связи с чем их следует считать первой мишенью при воздействии на клетку различными соединениями. Поскольку они являются белковыми компонентами плазматической мембраны, то изменения активности названных ферментов свидетельствуют о сдвиге в построении клеточной мембраны (Karasaki, Okigaki, 1976). К числу таких ферментов относятся и исследуемые в данной работе экто-АТФаза и щелочная фосфатаза, физиологическая роль которых до настоящего времени остается невыясненной. При выборе исследуемых ферментов учитывали существенное различие в их расположении, поскольку, как известно, экто-АТФаза относится к числу ферментов, независящих от мембранных липидов (Smolen, Weissmann, 1978; Куус и др., 1989), в то время как щелочная фосфатаза гидрофобной частью своей молекулы достаточно глубоко локализована в липидном бислое мембран (Мельничук и др., 1989; Пехливанов и др., 1989).

У отдельных популяций клеток лимфоидной системы выявлены существенные различия в экспонировании рецепторов и ферментативной активности их поверхности (Hennighausen, Lange, 1985). Известно также, что маркером *T*-лимфоцитов является поверхностная экто-АТФаза (Alders и др., 1988), а *B*-клеток — щелочная фосфатаза (Гольдберг и др., 1978). В связи с этим в данной работе представило интерес установление активности вышеназванных ферментов клеток тимуса и бурсы Фабрициуса цыплят, являющихся предшественниками соответственно *T*- и *B*-клеток лимфы.

Гормональные воздействия играют важную роль в регуляции обмена веществ и функционального состояния лимфоидных органов. При этом особое место принадлежит гормонам щитовидной железы, для которых на мембранах интактных лимфоцитов установлено существование высокоаффинных рецепторов (Frenvo и др., 1989), свидетельствующее о возможности непосредственного участия тироксина и трийодтиронина (T_3) в регуляции функций этих клеток. В наших предыдущих исследованиях установлено ингибирование экто-АТФазной активности лимфоцитов центральной лимфы овец при воздействии экзогенного трийодтиронина (Куус, Тамм, 1982). Однако при этом не выяснено влияние гормона на отдельные популяции лимфоидных клеток. Исходя из этого в настоящей работе сравнительно исследовалось воздействие трийодтиронина на активность поверхностно-локализованной экто-АТФазы и щелочной фосфатазы клеток тимуса и бурсы Фабрициуса цыплят в условиях *in vivo* и *in vitro*.

* Eesti Teaduste Akadeemia Eksperimentaalbioloogia Instituut (Институт экспериментальной биологии Академии наук Эстонии). 203051 Harku, Instituudi tee 11. Estonia.

Материал и методика

Выделение клеток тимуса и бурсы Фабрициуса двухмесячных цыплят-бройлеров проводили по стандартному методу.

В опытах *in vitro* исследуемые клетки инкубировали в течение 15, 30 и 60 мин при 20 °С и 3,5,3'-трийод-*L*-тиронином («Реанал») в концентрации 10^{-4} М и затем определяли активность экто-АТФазы по приросту неорганического фосфора в ферментативной реакции по методу О. Х. Лоури и А. Лопеса в модификации П. Скулачева (Никулина, 1965). Для сравнения использовали результаты опытов с эритроцитами, полученные ранее в аналогичных условиях (Куус и др., 1980).

В опытах *in vivo* цыплятам подкожно вводили T_3 в дозе 0,1 мг/кг живого веса и через 2 ч определяли экто-АТФазную активность клеток тимуса и бурсы Фабрициуса, а также активность щелочной фосфатазы этих клеток по методу О. А. Бессея, О. Х. Лоури и М. Ю. Брока с применением тестокомплектов «Фермогност» (ГДР) (Bessey и др., 1946). Параллельно определяли ферментативную активность клеток контрольных цыплят, которым вводили такое же количество физиологического раствора. Концентрации клеток в суспензиях определяли методом их подсчета в камере Горяева.

Все эксперименты проводили в 3—10 повторностях. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия.

Результаты и обсуждение

Сравнение ферментативной активности исследуемых клеток показало, что экто-АТФазная активность тимоцитов двухмесячных цыплят ($78,6 \pm 7,2$ нмоль Р на 10^6 клеток в час) несколько выше соответствующей активности клеток бурсы Фабрициуса ($65,4 \pm 6,0$ нмоль Р на 10^6 клеток в час). Активность же щелочной фосфатазы интактных клеток бурсы Фабрициуса превышала активность тимоцитов, составляя соответственно $286,8 \pm 24,6$ и $211 \pm 15,0$ нмоль 4-нитрофенола на 10^6 клеток в час. Однако столь существенного различия активностей этих поверхностно-локализованных ферментов, как в случае зрелых *T*- и *B*-клеток лимфы, у исследуемых предшественников этих клеток еще не наблюдается.

Опыты *in vitro* позволяют изучать первичные и прямые ответы на действие тиреоидных гормонов, исключая межтканевые и межорганные взаимодействия, которые *in vivo* могут маскировать или изменять характер исследуемых реакций (Архипенко, Погорелова, 1980). В результате инкубирования клеток тимуса и бурсы Фабрициуса с трийодтиронином отмечено существенное понижение их экто-АТФазной активности (рис. 1). При этом тимоциты были более чувствительными к гормону. Так, после 30-минутного инкубирования клеток активность тимоцитов снижалась на 25%, а клеток бурсы Фабрициуса лишь на 11%. Инкубирование с гормоном в течение 1 ч снижало изучаемую активность соответственно на 35 и 23%.

При сравнении этих данных с результатами о влиянии T_3 на экто-АТФазную активность интактных ядерных эритроцитов (Куус и др., 1980) бросается в глаза сходство между кривыми, характеризующими ингибирование изучаемого фермента разных типов клеток. Кроме того, как видно из рис. 1., зависящее от времени инкубирования снижение ферментативной активности клеток проявляется уже в течение первых 15 мин их контакта с гормоном.

В опытах *in vivo* отмечено существенное снижение экто-АТФазной активности уже через 2 ч после введения цыплятам T_3 — у тимоцитов на 42 и у клеток бурсы Фабрициуса на 35% по сравнению с контролем (рис. 2). Выявленную при этом несколько большую чувствительность

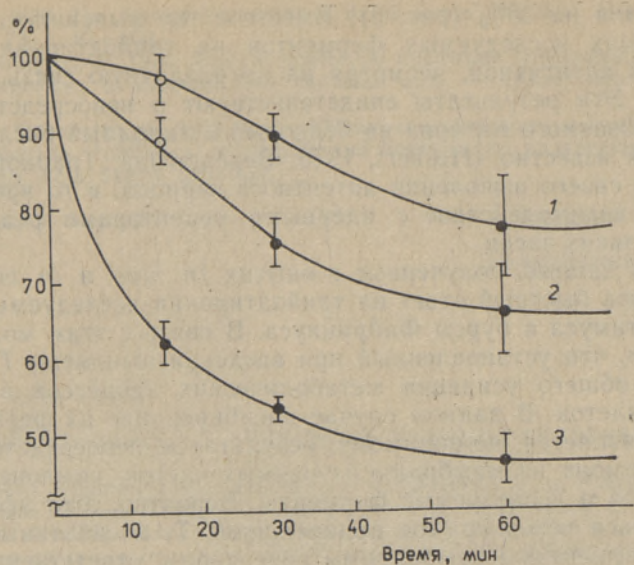


Рис. 1. Экто-АТФазная активность клеток бурсы Фабрициуса (1), тимоцитов (2) и эритроцитов (3) цыплят в процентах от контроля в зависимости от продолжительности инкубирования клеток с трийодтиронином в условиях *in vitro*. Данные, приведенные на кривой 3, получены ранее (Куус и др., 1980).

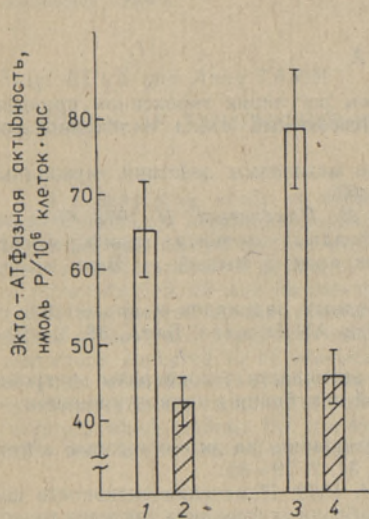


Рис. 2. Экто-АТФазная активность клеток бурсы Фабрициуса и тимоцитов цыплят в контроле соответственно столбцы 1 и 3) и через 2 ч после введения трийодтиронина (столбцы 2 и 4).

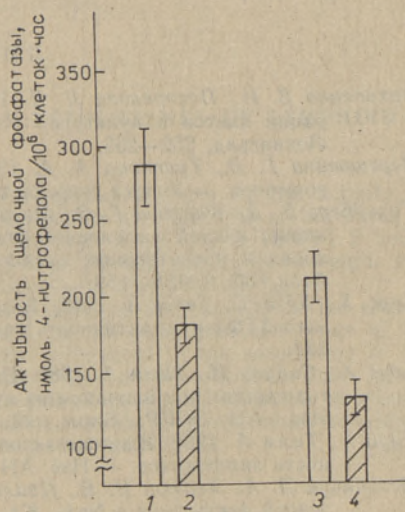


Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы клеток бурсы Фабрициуса и тимоцитов цыплят в контроле (соответственно столбцы 1 и 3) и через 2 ч после подкожной инъекции T_3 (столбцы 2 и 4).

активности экто-АТФазы тимоцитов по сравнению с клетками бурсы Фабрициуса можно, по-видимому, объяснить различиями плазматических микросред (плотность заряженных групп и т. д.), окружающих этот фермент в мембранах изучаемых клеток (Hrabák и др., 1985), а также функциональными различиями этих клеток.

Ответ щелочной фосфатазы на введение цыплятам трийодтиронина оказался у обоих видов клеток одинаковым. Так, активность клеток бурсы Фабрициуса снижалась через 2 ч после введения T_3 на 37,

а у тимочитов на 38% (рис. 3). Вместе с тем выяснилось также, что реакция обоих исследуемых ферментов на трийодтиронин оказалась практически идентичной, несмотря на их различную связь с клеточной мембраной. Эти результаты свидетельствуют о непосредственном воздействии названного гормона на белковый и липидный бислой мембран, которое, как известно (Hulbert, 1978; Верещагина, Трапкова, 1984), не требует для своего выявления латентного периода, в то время как специфическое взаимодействие с ядерными рецепторами реализуется не ранее нескольких часов.

Обобщая данные, полученные в опытах *in vivo* и *in vitro*, необходимо отметить быстрый ответ на трийодтиронин исследуемых активностей клеток тимуса и бурсы Фабрициуса. В связи с этим можно сделать вывод о том, что установленный при введении цыплятам T_3 эффект не зависит от общего усиления метаболических процессов в мембранах изучаемых клеток. В данном случае ингибирование их ферментативной активности является, по-видимому, результатом непосредственного воздействия гормона на мембраны изучаемых клеток, компонентами которых являются и исследуемые ферменты. Вероятно, этот эффект может осуществляться через прямое прикрепление T_3 к связанным с поверхностными ферментами мембранным рецепторам, ответственным за вход гормона в клетку. Для выяснения подробного механизма этого процесса необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Архипенко В. И., Погорелова Л. Я. 1980. Механизмы регуляции тироксином пролиферации клеток в культуре. — В кн.: II Всесоюзный съезд эндокринологов. Ленинград, 252—253.
- Верещагина Г. В., Трапкова А. А. 1984. Некоторые механизмы действия тиреоидных гормонов. — Успехи совр. биол., 97, 3, 447—457.
- Гольдберг Е. Д., Карпова Г. В., Мелик-Гайказян Е. В., Пахряева Г. Н. 1978. О содержании кислой и щелочной фосфатаз в лимфоидных элементах периферической крови и кроветворных органов у интактных крыс и мышей. — Бюл. exper. биол., 85, 2, 158—159.
- Куус Х., Кэп Т., Тамм А. 1989. Воздействие свободных радикалов и альдегидов на экто-АТФазную активность тимочитов. — Изв. АН Эстонии. Биол., 38, 3, 180—184.
- Куус Х., Сибуль И., Тамм А. 1980. Ингибирование активности эктоапиразы эритроцитов цыплят под влиянием их предварительной инкубации с трийодтиронином. — Изв. АН ЭССР. Биол., 29, 1, 7—10.
- Куус Х., Тамм А. 1982. Влияние экзогенного трийодтиронина на эктоапиразную активность лимфоцитов. — Изв. АН ЭССР. Биол., 31, 2, 79—85.
- Мельничук Д. А., Усатюк Н. В., Цвилховский Н. И. 1989. Изменения активности щелочной фосфатазы и Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранных фракциях эпителия тонкой кишки в норме и при диарее. — Физиол. журн., 35, 3, 99—102.
- Никулина Г. Н. 1965. Обзор методов колориметрического определения фосфора по образованию «молибденовой сини». Ленинград.
- Пехливанов Бл., Цветкова Т., Пиперков Т., Чичовска М. 1989. Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса (обзор литературы). — Лаб. дело, 11, 4—7.
- Alders, R. G., Landsverk, T., Shelton, J. N. 1988. Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphate: An enzyme marker for bovine T lymphocytes. — Immunol. Cell Biol., 66, 5—6, 361—367.
- Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J. 1946. Method for the determination of alkaline phosphatase. — J. Biol. Chem., 164, 321—329.
- Frenvo, V. L., Rudas, P., Pethes, G., Dostalova, M., Kacskovics, I., Kondor, G. 1989. Thyroid and prolactin receptors on bovine lymphocytes and mammary epithelial cells. — In: XXXI Intern. Congr. Physiol. Sciences, Helsinki, 182.
- Hennighausen, G., Lange, P. 1985. Activity of ecto-ATPase in different populations of mouse and rat lymphocytes. — Biomed. biochim. acta, 44, 7—8, 1269—1272.
- Hrabák, A., Szabó, M. T., Antoni, F. 1985. Characteristic biochemical differences in human T and B lymphocytes separated on nylon wool. — Int. J. Biochem., 17, 1, 113—117.

- Hulbert, A. J. 1978. The thyroid hormones: a thesis concerning their action. — J. Theor. Biol., 73, 1, 81—100.
- Karasaki, S., Okigaki, T. 1976. Surface membrane nucleoside triphosphatase activity and tumorigenicity of cultured liver epithelial cells. — Cancer Res., 36, 12, 4491—4499.
- Smolen, J. E., Weissmann, G. 1978. Mg²⁺-ATPase as a membrane ecto-enzyme of human granulocytes. Inhibitors, activators and response to phagocytosis. — Biochim. Biophys. Acta, 512, 3, 525—538.

Представил У: Маргна

Поступила в редакцию
19/III 1991
Переработанный вариант
20/VI 1991

Helgi KUUS, Anna TAMM

TRIJOODTÜRONIINI MÕJU LÜMFOIDSETE RAKKUDE EKTOFERMENTIDELE

On võrreldud trijoodtüroniini (T₃) mõju tibu tümotsüütide ja Fabriciuse bursa rakkude pinnافرментide ekto-ATPaasi ja aluselise fosfataasi aktiivsusele *in vivo* ja *in vitro*. Ektofermentide aktiivsus määrati 2 tundi pärast hormooni ühekordset manustamist (0.1 mg kehakaalu 1 kg kohta) ja *in vitro* pärast intaktsete rakkude inkubeerimist 10⁻⁴ M T₃-ga 15, 30 ja 60 minuti jooksul.

Tehti kindlaks, et mõlema raku tüübi ektofermentide aktiivsus langes oluliselt pärast hormooni manustamist. Seejuures osutus täheldatud muutuste ulatus identseks, hoolimata uuritavate fermentide erinevast seosest rakumembraanidega. Saadud andmete põhjal on järeldatud, et ektofermentide aktiivsuse inhibeerimine tuleneb vahetult T₃ kinnitumisest pinnافرментidega seotud membraani retseptorite külge, mis vahendavad hormooni sisenemist raku.

Helgi KUUS and Anna TAMM

ACTION OF TRIIODOTHYRONINE ON THE ECTOENZYMES OF LYMPHOID CELLS

A comparative study of triiodothyronine (T₃)-induced changes in the activity of ekto-ATPase and alkaline phosphatase of chick thymocytes and the cells of the bursa of Fabricius was carried out *in vivo* and *in vitro*. The action of T₃ was studied 2 hours after a subcutaneous injection of the hormone in dose 0.1 mg per kg body-weight and *in vitro* after 15, 30 and 60 min-incubation of intact cells with 10⁻⁴ M T₃.

It was cleared up that after an injection of the hormone the activity of the ectoenzymes of both cell types was essentially decreased. At the same time the range of the alterations appeared to be identical in spite of the differences in the association of the enzymes with the cell-plasma membranes. On the bases of the obtained data it was concluded that the reducing effect of T₃ was the result of its direct link to the membrane receptors which mediate the transport of the hormone into the cell, and which simultaneously may be in connection with the ectoenzymes under examination.