

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 612.22.014.3

*Е. В. Нюпенко, М. П. Панченко, Ю. А. Романов\*, А. В. Гришин, Н. В. Кабаева\*, А. С. Антонов\*, В. А. Ткачук*

### АТФ-ДЕГРАДИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАН ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ: ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ГИДРОЛИЗА, КЛЕТОЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ

Лаборатория молекулярной эндокринологии\*, отдел клеточной биологии, Кардиологический научный центр России

#### ATP-DEGRADING ACTIVITY OF MEMBRANES FROM LUNG TISSUE: PECULIARITIES OF HYDROLYSIS, CELLULAR SPECIFICITY AND LOCALIZATION.

*E. V. Nupenko, M. P. Panchenko, Yu. A. Romanov, A. V. Grishin, N. V. Kabaeva, A. S. Antonov, V. A. Tkachuk*

#### Summary

Peculiarities of ATP and ADP degradation by lung membranes were studied. It was shown that AMP is the final product of ATP hydrolysis. AMP is formed from ATP by sequential release of terminal phosphate according to the scheme:

ATP → ADP → AMP, and not by pyrophosphatase activity.

Inhibitory analysis using adenine nucleotides, their nonhydrolyzable analogs, phosphate and pyrophosphate and also determination of kinetic values ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) for the ATP-ase and ADP-ase reactions indicates on a coordinated hydrolysis of ATP and ADP.

ATP-degrading activity is discovered in membranes of cells formed a blood vessels (endothelial and smooth-muscle), but not in membranes of Type II alveolar cells, which secrete surfactant.

This nucleotide hydrolysing activity is preferentially localised on a luminal surface of plasma membrane, since addition of a pore-forming antibiotic alameticine to a confluent endothelial monolayer does not significantly increase the ATP hydrolysis.

#### Резюме

Исследованы особенности деградации АТФ и АДФ под действием мембран легких. Показано, что гидролиз АТФ протекает с образованием конечного продукта реакции АМФ. Образование АМФ из АТФ происходит за счет последовательного отщепления терминального фосфата согласно схеме: АТФ → АДФ → АМФ, а не за счет пиррофосфатазной активности.

Ингибиторный анализ с использованием адениловых нуклеотидов, их негидролизующих аналогов, фосфата и пиррофосфата, а также определение кинетических параметров АТФ-азной и АДФ-азной реакций указывает на согласованное протекание стадий гидролиза АТФ.

АТФ-деградирующая активность обнаружена в мембранах клеток, формирующих сосуды (эндотелиальных и гладкомышечных) и не обнаружена в мембранах альвеолоцитов II порядка — клетках альвеол, секретирующих сурфактант.

Данная нуклеотид-гидролизующая активность локализована преимущественно на внешней стороне плазматической мембраны клетки, поскольку добавление порообразующего антибиотика аламетицина к нативному монослою эндотелия незначительно увеличивало скорость гидролиза АТФ.

#### Введение

Одной из физиологических особенностей легких является их способность к быстрой деградации циркулирующих в кровяном русле адениловых нуклеотидов. Показано, что данной

Авторы статьи выражают глубокую благодарность младшему научному сотруднику кафедры биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова М. В. Панченко за оказанную помощь в проведении экспериментов.

активностью обладают клетки сосудистой стенки (эндотелиальные и гладкомышечные) благодаря наличию на внешней поверхности плазматической мембраны этих клеток экзоферментов, катаболизирующих АТФ до АМФ или аденозина [1—3]. Содержащиеся в крови АТФ, АДФ и аденозин регулируют агрегацию тромбоцитов, модулируют секреторную активность эндотелиальных и сократительную активность гладкомышечных клеток сосудов [1]. Функционирование экзоферментов может играть ключевую роль в «выключении» внешних сигналов этих соединений на клетки-мишени. В то же время наличие деградирующей активности необходимо учитывать и при изучении различных АТФ-зависимых ферментативных активностей, как это было установлено, в частности, для гормончувствительной аденилатциклазы мембран легких [4].

В настоящей работе были исследованы клеточная специфичность и особенности деградации АТФ и других адениловых нуклеотидов под действием мембран, выделенных из целых легких, а также из культивируемых эндотелиальных и гладкомышечных клеток.

## Методы

### *Выделение и культивирование эндотелиальных и гладкомышечных клеток*

Первичные культуры эндотелиальных клеток из легочной артерии и аорты человека получали как описано А. S. Antonov et al. [2] с незначительными модификациями. Сосуды забирали в асептических условиях, разрезали и отмывали от остатков крови сбалансированным солевым раствором Эрла (EBSS). Сосуды инкубировали в 0,15 % диспазе на среде M199 в течение 90—120 мин при 37 °С. Суспензию эндотелиальных клеток центрифугировали в течение 10 мин при 600 g и ресуспендировали в среде M199, содержащей 25 мМ HEPES, 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 10 % NBS, 100 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток и 5 U/мл гепарина. Клетки культивировали до состояния конфлюэнтного монослоя на чашках Петри (d=100 мм), покрытых 0,1 % желатином. Эндотелиальные клетки идентифицировали по присутствию телец Вейбеля—Паладе и антигена VIII фактора [2]. Монослой эндотелиальных клеток (после 7—9 дней культивирования) промывали EBSS, снимали 0,05 % трипсином с добавлением 0,02 % ЭДТА и пассировали в соотношении 1:3. Для выделения мембран использовали культуры 3—4 пассажа.

Для выделения первичных культур гладкомышечных клеток интимы использовали фрагменты визуально «нормальных» аорт. После удаления эндотелия и дополнительной промывки EBSS фрагменты помещали в 0,2 % коллагеназу на сре-

де роста гладкомышечных клеток и инкубировали 3—4 часа при 37 °С. Среда роста гладкомышечных клеток была аналогична среде роста эндотелия, но не содержала фактора роста эндотелиальных клеток и гепарин. Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 600 g, ресуспендировали в среде роста гладкомышечных клеток и высевали на чашки Петри (d=60 мм). Через 48 часов культуры отмывали EBSS и заменяли среду роста на свежую.

Эндотелий пупочной вены человека получали и культивировали согласно методам А. S. Antonov et al.; E. A. Jaffe et al. [3, 13]

### *Выделение плазматических мембран из эндотелиальных клеток и гомогената легких*

Эндотелиальные клетки с 5 чашек Петри (d=100 мм) трижды промывали 5 мл среды M199 и дважды 2 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5; температура 4 °С) и 150 мМ NaCl. Все последующие процедуры проводили при температуре 4 °С. Клетки снимали механически и смывали 10 мл этого же буфера. Суспензию клеток центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Осадок переносили в гомогенизатор (стекло-тефлон, V=5 мл) и гомогенизировали в 1 мл буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 0,5 мг/мл лейпептина (буфер А). Гомогенат центрифугировали при 50 000 об/мин в течение 60 мин в роторе Ту-65. Осадок мембран переносили в гомогенизатор стекло-стекло (V=100 мкл) и суспендировали в 500 мкл буфера А. Полученную суспензию мембран замораживали в жидком азоте аликвотами по 50—100 мкл и хранили при —70 °С.

Мембраны альвеолоцитов II порядка были получены из легких крысы и любезно предоставлены J. Brody (Пульмонологический центр Бостонского университета, США).

Для получения суммарной фракции плазматических мембран использовали легкие свиньи, что связано с доступностью исходного материала. Мембраны получали как описано ранее Е. V. Nurenko [16]. На отсутствие видовой специфичности АТФ-деградирующей активности может указывать ее наличие в легочной ткани и эндотелии различных представителей класса млекопитающих (быка, свиньи, крысы, кролика, человека — непредставленные данные и работы Р. G. Hellewell [12]).

### *Определение АТФ-деградирующей активности мембран*

АТФ-деградирующую активность измеряли по накоплению продуктов ее гидролиза АДФ и АМФ. Среда инкубации (конечный объем 50 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5; температура 37 °С), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ),

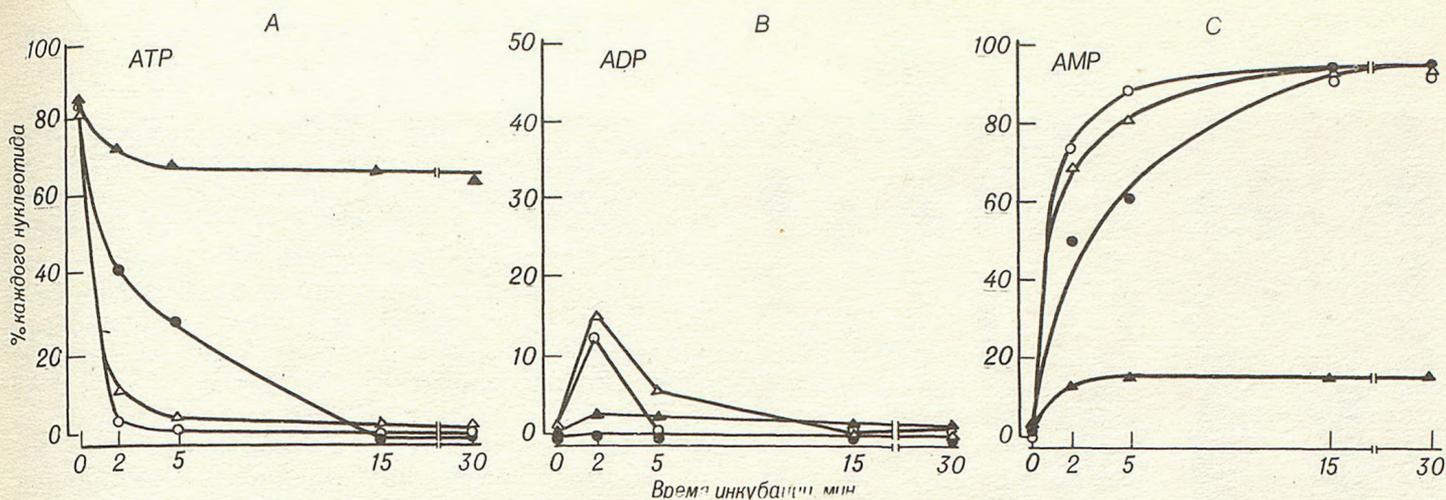


Рис. 1. Кинетика гидролиза  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ мембранами легких в отсутствие (○ ---) и в присутствии аденилаткиназы (△ --- △); креатинкиназы и креатинфосфата (● --- ●); аденилаткиназы, креатинкиназы и креатинфосфата (▲ --- ▲). Среда инкубации (конечный объем 50 мкл) содержала 0,2 мМ АТФ, 0,1 мКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ, 10 мкг мембранного белка и, где указано, 0,5 мг/мл аденилаткиназы, 0,5 мг/мл креатинкиназы и 20 мМ креатинфосфата. В указанные временные интервалы брали из среды гидролиза аликвоты 1 мкл и наносили на пластинку с PEI-целлюлозой. Образцы хроматографировали, пятна  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АДФ и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АМФ на пластине выявляли автордиографией, радиоактивность пятен считали как описано в разд. «Материалы и методы».

0,1—0,5 мМ АТФ, 0,1—0,5 мКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ и 10—20 мкг белка мембран. Креатинкиназу (0,5 мг/мл), креатинфосфат (20 мМ), аденилаткиназу (0,1 мг/мл), адениловые нуклеотиды ( $10^{-4}$  М), фосфат или пирозфосфат (20 мМ) вносили непосредственно в исследуемые пробы до указанных конечных концентраций при температуре 4 °С. Реакцию начинали добавлением прогретой до 37 °С среды инкубации. После чего пробы инкубировали 15 мин при температуре 37 °С. В экспериментах, проводимых на монослое эндотелиальных клеток, конечный объем среды составлял 500 мкл и содержал 5 мКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ. Реакцию останавливали нанесением аликвот ( $V=2$  мкл) из среды инкубации на пластину с PEI-целлюлозой («Sigma») и образцы хроматографировали в 1 М LiCl. Пятна, содержащие радиоактивные АТФ, АДФ и АМФ, визуализировали автордиографией, вырезали и просчитывали в сцинтилляторе ЖС-6 на  $\beta$ -счетчике («ЛКВ»). При использовании немеченых нуклеотидов их концентрация в среде составляла 1 мМ, а время инкубации с мембранами 15—90 мин. Реакцию останавливали нанесением аликвот (20 мкл) на пластину с PEI-целлюлозой. Пятна, содержащие нуклеотиды, визуализировали и фотографировали в УФ-свете (265 нм).

АТФ-азную и АДФ-азную активности мембран регистрировали на спектрофотометре «Hitachi-557» по высвобождению  $\text{H}^+$  в результате гидролиза нуклеотида [1]. Для регистрации  $\text{H}^+$  использовали рН-индикатор феноловый красный, изменения оптической плотности регистрировали при паре длин волн 557 и 620 нм (максимальная разность поглощений протонированного и депротонированного индикатора [5]). Среда инкубации (конечный объем 2 мл) содержала: 2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,5, температура 37 °С), 30 мкМ

фенолового красного, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,0125—1,0 мМ Mg-АТФ или Mg-АДФ и 40 мкг легочных мембран.

Определение белка проводили согласно методу Петерсона [21] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

## Материалы

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ (10—50 Ки/ммоль) получены от фирмы «Amersham» (Англия); Трис, ЭДТА, ЭГТА, (+)-дитиотрейтол (ДТТ), АТФ, АМФ, креатинфосфат, аденилаткиназа, фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ), гепарин — от фирмы «Sigma» (США); диспаза, креатинкиназа, АДФ, АДФ $\beta$ S, AppNHp — от фирмы «Boehringer — Mannheim» (Германия); среда M199 с солями Эрла, сбалансированный солевой раствор Эрла (EBBS), L-глутамин, пенициллин; стрептомицин, пируват натрия, сыворотка новорожденного теленка и трипсин — от фирмы «CIBOO» или «Flow»; фактор роста эндотелиальных клеток (NBS) выделяли из мозга человека согласно методу Maeiag et al. [11]. Посуду для культивирования клеток получали от фирм «Costar» или «Corning» (США). Культуральные среды и растворы стерилизовали фильтрацией через мембранные фильтры фирмы «Nalgene» (США) (размер пор 0,45  $\mu$ ).

## Результаты

Добавление к плазматическим мембранам легких 0,2 мМ  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ вызывает быструю деградацию нуклеотида до АМФ (рис. 1, А, С). Гидролиз АТФ до АМФ происходит быстро, поэтому зарегистрировать промежуточный продукт реакции АДФ удается только в первые 2 мин

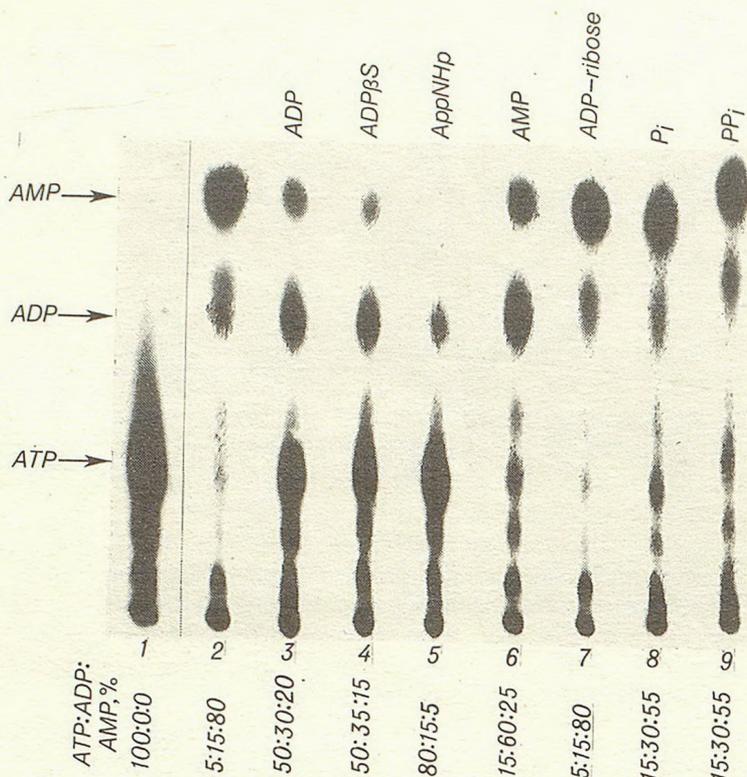


Рис. 2. Влияние адениловых нуклеотидов, фосфата и пирофосфата на гидролиз  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ мембранами легких.

Среда инкубации ( $V=50$  мкл) содержала 10 мкг белка мембран легких, 0,2 мМ АТФ, 0,2 мкКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ; 1 мМ указанных на рисунке нуклеотидов, 20 мМ  $\text{P}_i$  или 20 мМ  $\text{PP}_i$ . Пробы инкубировали 5 мин, по окончании инкубации аликвоты объемом 1 мкл наносили на PEI-целлюлозу и хроматографировали. Распределение радиоактивности в пятнах рассчитывали, принимая за 100 % радиоактивность в исходном пятне  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ.

инкубации (рис. 1, В). В присутствии креатинкиназы (0,5 мг/мл) и креатинфосфата (20 мМ) — сопряженной ферментативной системы, обеспечивающей ресинтез АТФ из АДФ — мембранозависимая деградация АТФ и, соответственно, накопление АМФ в среде несколько замедляется. Внесение аденилаткиназы (0,5 мг/мл) не влияет на скорость деградации АТФ до АМФ. В присутствии креатинкиназы, креатинфосфата и аденилаткиназы не более 20 % исходной  $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ выявляется в пятне  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АМФ. Поддержание на постоянном уровне концентрации АТФ в течение длительной инкубации указывает на эффективное протекание реакций ресинтеза АТФ из АМФ за счет сопряженных ферментативных реакций, как было нами ранее установлено [4].

Внесение в среду гидролиза  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ адениловых нуклеотидов: AppNHp, АДФ, АДФβS, АМФ или АДФ — рибозы до конечной концентрации 1 мМ замедляет начальную скорость деградации АТФ и меняет соотношение между продуктами гидролиза — АДФ и АМФ. Как видно из рис. 2, линия 2,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ на 80 % гидролизуется до  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АМФ за 2 мин инкубации. За это время 15 % исходной метки выявляется в пятне  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АДФ. Добавление вместе

с  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ немеченых АДФ или АДФβS тормозит гидролиз  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ и промежуточного продукта  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АДФ до  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АМФ (рис. 2, линии 3,4). АМФ в концентрации 1 мМ тормозит гидролиз меченого АДФ до АМФ и в меньшей степени влияет на гидролиз меченого АТФ до АДФ (рис. 2, линия 6). Негидролизуемый по β-γ фосфорильной связи аналог АТФ — AppNHp значительно подавляет гидролиз  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ до  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АДФ и почти полностью ингибирует гидролиз  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АДФ до  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АМФ (рис. 2, линия 5). АДФ-рибоза, а также  $\text{P}_i$  (20 мМ) и  $\text{PP}_i$  (20 мМ) практически не влияют на деградацию АТФ (рис. 2, линии 7, 8, 9). По эффективности ингибирования деградации АТФ указанные выше соединения можно расположить в следующей последовательности:

$\text{AppNHp} > \text{АДФ}\beta\text{S} > \text{АДФ} > \text{АМФ} > \text{P}_i = \text{PP}_i > \text{АДФ-рибоза}$ .

Добавленный к мембранам легких АДФ (1 мМ) быстро гидролизуется с образованием АМФ (рис. 3). Негидролизуемый по β-γ фосфорильной связи аналог АТФ — AppNHp (1 мМ) не подвергается гидролизу мембранами легких и сохраняется в среде даже при увеличении времени инкубации до 90 мин.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что мембранозависимая деградация АТФ

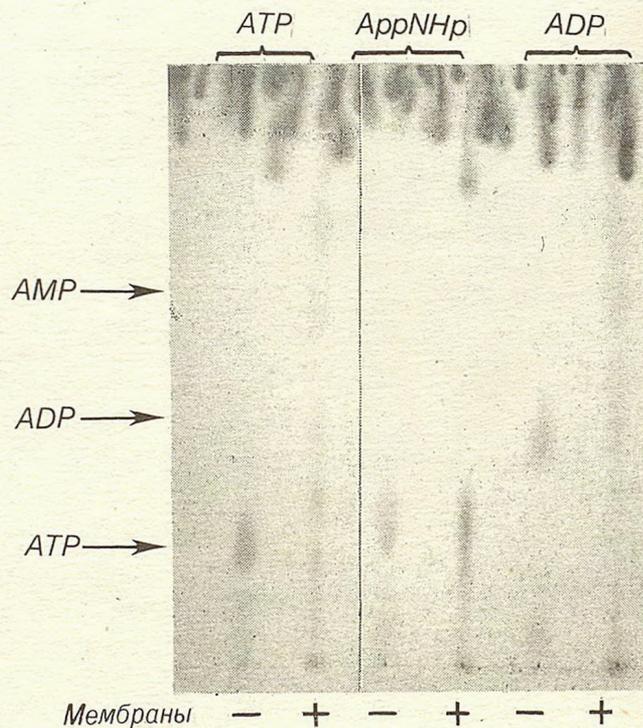


Рис. 3. Анализ продуктов гидролиза АТФ, AppNHp и АДФ мембранами легких.

Среда инкубации ( $V=50$  мкл) содержала 1 мМ соответствующего нуклеотида и, где указано, 20 мкг легочных мембран. Пробы инкубировали 15 мин, аликвоты объемом 1 мкл отбирали, наносили на пластинку с PEI-целлюлозой и хроматографировали. Пятна, содержащие нуклеотиды, визуализировали по поглощению в ультрафиолетовой области спектра.

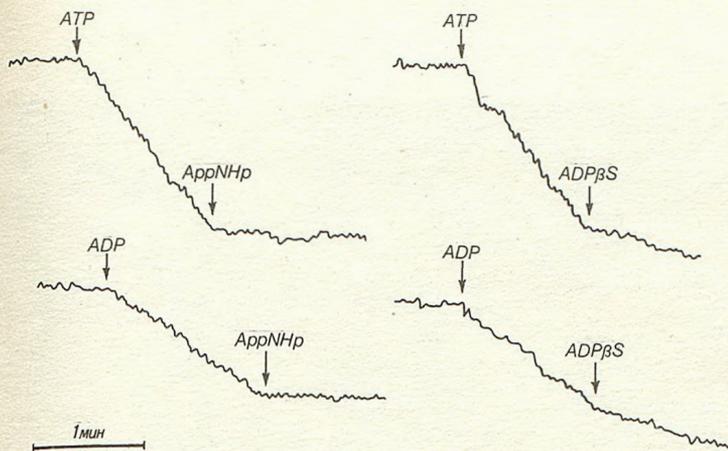


Рис. 4. Подавление AppNHp и АДФβS АТФ-азной и АДФ-азной активностей легочных мембран.

Реакцию начинали внесением АТФ или АДФ до конечной концентрации 2 мМ в среду инкубации ( $V=2$  мл), содержащую 50 мкг мембранного белка и рН-индикатор феноловый красный (см. «Материалы и методы»); по ходу реакции в среду гидролиза добавляли AppNHp или АДФβS до конечной концентрации 0,2 мМ.

до АМФ происходит последовательно с отщеплением терминального фосфата от АТФ и АДФ. При этом, как было показано спектрофотометрическим методом регистрации собственно АТФ-азной и АДФ-азной активностей мембран легких, обе реакции эффективно подавлялись под действием AppNHp и в меньшей степени под действием АДФβS (рис. 4).

Как показали эксперименты по определению АТФ-деградирующей активности в нативном монослое эндотелиальных клеток, данная активность выявляется в основном на внешней поверхности плазматической мембраны эндотелия. Добавление к монослою порообразующего антибиотика аламетицина увеличивает скорость гидролиза АТФ не более чем на 12 % (рис. 5, линии 2,5).

Результаты по определению кинетических параметров гидролиза АТФ и АДФ —  $V_{max}$  и  $K_m$  представлены на рис. 6 и в таблице. Данные величины определялись как на легочных мембранах, так и на монослое культивируемых эндотелиальных клеток, т. е. в условиях, наиболее приближенных к состоянию *in vivo*. Полученные независимыми методами определения кинетические параметры для каждой реакции близки по значению и согласуются с данными Pearson et al. [2].

АТФ-деградирующая активность, выявленная на мембранах целых легких, была исследована также в мембранах разных типов сосудистых и легочных клеток. Как видно на рис. 7, гидролиз АТФ до АМФ происходит как в присутствии мембран легких, так и в присутствии мембран эндотелиальных и гладкомышечных клеток. В свою очередь в мембранах альвеолоцитов II порядка — клетках альвеол, ответственных за синтез и секрецию сурфактанта, АТФ-деградирующая активность не обнаружена.

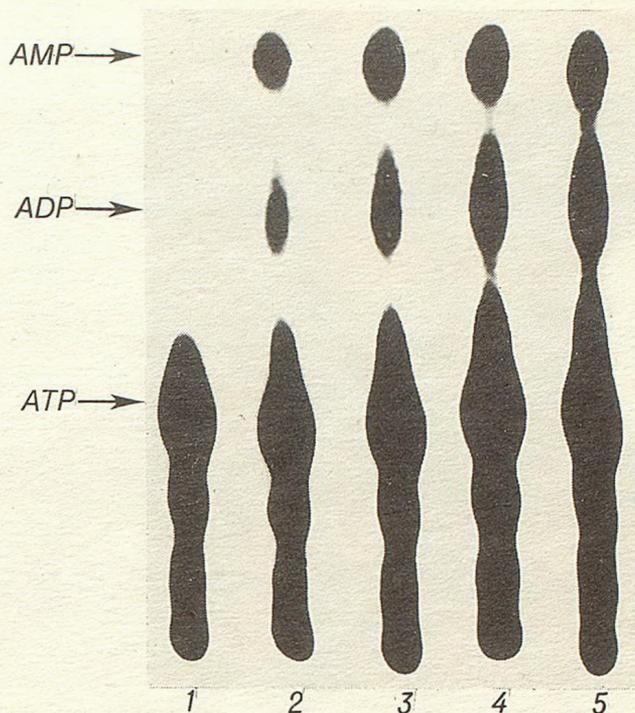


Рис. 5. Влияние аламетицина на гидролиз АТФ монослоем эндотелиальных клеток легочной артерии.

Клетки отмывали от среды роста 10 мл среды 199 и инкубировали в 0,5 мл той же среды 199 в течение 15 мин при 37 °С, без аламетицина (2) и в присутствии 5 мкг/мл (3), 20 мкг/мл (4) или 50 мкг/мл (5) аламетицина. Реакцию гидролиза начинали добавлением прогретой до 37 °С смесью 0,2 мМ АТФ+2 мКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ. Перед началом инкубации 1 мкл метки наносили на РЕИ-целлюлозу (1). По окончании 15 мин инкубации из среды отбирали 20 мкл аликвоты и хроматографировали. Продукты гидролиза  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ анализировали как описано в разд. «Материалы и методы».

## Обсуждение

Как было установлено нами ранее [16], кажущаяся низкая активность аденилатциклазы в легких по сравнению с таковой в сердце, печени и мозге млекопитающих связана с высокой скоростью деградации АТФ (субстрата аденилат-

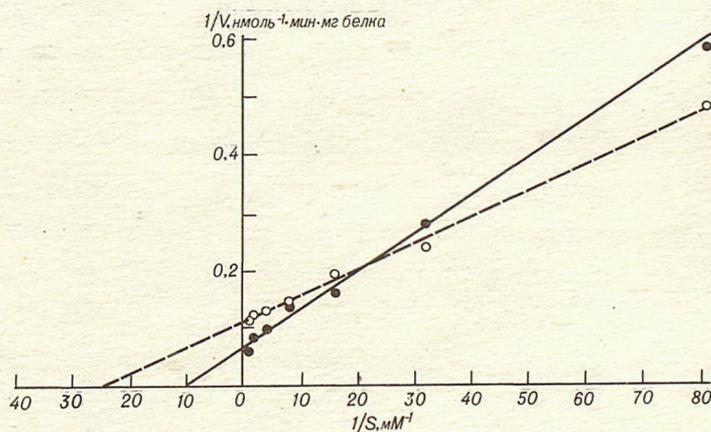


Рис. 6. Зависимость скоростей АТФ-азной (● — — ●) и АДФ-азной (○ --- ○) реакций от концентрации субстрата. Значения рассчитанных  $K_m$   $V_{max}$  для обеих реакций представлены в таблице.

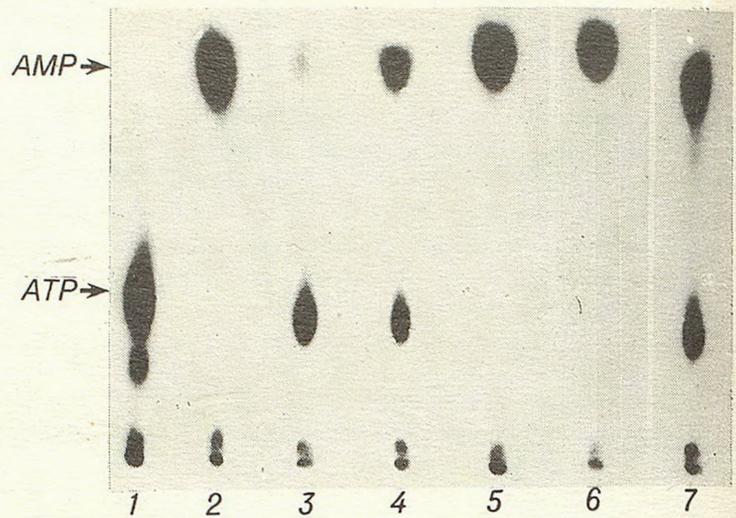
Т а б л и ц а

Значение кинетических параметров для АТФ-азной и АДФ-азной реакций

|                            | $K_m$ АТФ | $V_{max}$ АТФ  | $K_m$ АДФ | $V_{max}$ АДФ  |
|----------------------------|-----------|--|-----------|--|
| Мембраны легких            | 90 мкМ    | 175 нмоль/мин/мг белка мембран                             | 40 мкМ    | 33 нмоль/мин/мг белка мембран                            |
| Эндотелий легочной артерии | 660 мкМ   | 134 нмоль/мин/мг белка мембран<br>34 нмоль/мин/ $10^6$ кл. | 200 мкМ   | 33 нмоль/мин/мг белка мембран<br>9 нмоль/мин/ $10^6$ кл. |

циклазы) под действием легочных мембран. Эта особенность легких показана также в экспериментах на изолированном перфузированном легком [12]. Перфузия легких растворами АТФ, АДФ и АМФ приводила к гидролизу данных нуклеотидов до аденозина. На аналогичной модели было показано, что время выхода меченых нуклеотидов совпадало с выходом  $^{14}C$ -декстрана, который не захватывается легочными клетками и может являться маркером сосудов [9]. Это позволило сделать вывод, что основная нуклеотидгидролизующая активность в легких приходится на эндотелиальные клетки сосудов, непосредственно контактирующие с перфузируемым раствором. Показано также, что подобная АТФ-деградирующая активность присуща монослою культивируемых эндотелиальных и гладкомышечных клеток [18, 19]. В наших экспериментах по исследованию данной активности в разных типах клеток было установлено, что АТФ гидролизуется до АМФ мембранами, выделенными из целых легких, и мембранами клеток, формирующих сосуды (эндотелий легочной артерии, пупочной вены, эндотелиальные и гладкомышечные клетки аорты). В мембранах альвеолоцитов II порядка — клетках альвеол, секретирующих сурфактант, данная активность не была обнаружена. Интересно отметить, что мембраны эндотелиальных клеток разных сосудов содержат сравнимую по величине АТФ→АМФ деградирующую активность. В свою очередь скорость гидролиза АТФ мембранами целого легкого немного выше, возможно, благодаря наличию АТФ-деградирующей активности в мембранах гладкомышечных и других типов легочных клеток, а также благодаря более высокому уровню экспрессии ферментов, гидролизующих АТФ, в легком по сравнению с культивируемыми клетками.

Известно, что более половины от общего количества эндотелиальных клеток человека приходится на эндотелий легочных сосудов. Принимая во внимание высокую АТФ-деградирующую активность эндотелиальных клеток, можно заключить,

Рис. 7. Гидролиз  $[\alpha\text{-}^{32}P]$  АТФ мембранами разных типов клеток.

Среда инкубации ( $V=50$  мкл, алиquotу 1 мкл наносили на РЕИ-целлюлозу перед началом инкубации (1)) содержала 0,2 мМ АТФ, 2 мкКи  $[\alpha\text{-}^{32}P]$  АТФ 20 мкг мембранного белка, выделенного из целых легких (2); альвеолоцитов II порядка (3); эндотелия пупочной вены (4); эндотелия легочной артерии (5); эндотелия аорты (6); гладкомышечных клеток аорты (7).

что метаболическая активность легких в отношении гидролиза адениловых нуклеотидов обусловлена высоким содержанием кровеносных сосудов в данной ткани.

Помимо очистки крови малого круга кровообращения от АТФ и АДФ, функциональная роль эндотелия легочных сосудов заключается также в инактивации циркулирующих в кровяном русле ряда метаболически активных веществ: тромбина, серотонина, некоторых простагландинов, ANF, брадикинина [14, 17, 22]. Инактивация брадикинина, в частности, осуществляется ангиотензинпревращающим ферментом, локализованным на внешней поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток [22]. Подобная локализация ферментов, гидролизующих адениловые нуклеотиды может определяться их функциональной нагрузкой, связанной с очисткой крови от избыточных количеств адениловых нуклеотидов, являющихся вазоактивными и тромбообразующими агентами. Можно полагать, что эффективная деградация АТФ и АДФ на внешней поверхности плазматической мембраны клетки может снижать действующие концентрации этих нуклеотидов вблизи пуриnergических рецепторов и способствовать ослаблению агонистзависимой активации пуриnergических рецепторов и сопряженных с ними систем вторичных мессенджеров. Высказывалась гипотеза о том, что нуклеотидазная активность может быть присуща самим пуриnergическим рецепторам. Однако подробный анализ связывания пуриновых нуклеотидов и их оптически активных аналогов с рецепторами, а также их деградация мембранными нуклеотидазами показал, что рецепторная и АТФ-дегради-

ующая активности присущи разным белковым молекулам [10].

Выявленные в наших экспериментах особенности протекания мембранозависимой деградации АТФ указывают на то, что образование АМФ из АТФ происходит за счет последовательно-го отщепления терминального фосфата от нуклеотида согласно схеме: АТФ → АДФ → АМФ, а не за счет АТФ-пирофосфатазной активности, заключающейся в отщеплении пирофосфата от АТФ. В пользу этого вывода свидетельствуют следующие экспериментальные факты: 1) гидролиз АТФ до АМФ происходит с образованием промежуточного продукта реакции АДФ; 2) устойчивый к гидролизу по β-γ фосфорильной связи, но не по α-β фосфорильной связи аналог АТФ—AppNHp не подвергается деградации до АМФ под действием мембран и эффективно препятствует последовательному гидролизу АТФ до АДФ и АМФ под действием мембран; 3) добавление избытка «холодного» АДФ и его аналога АДФβS (в качестве «ловушки» для [α-<sup>32</sup>P] АДФ) в среду гидролиза препятствует гидролизу [α-<sup>32</sup>P] АДФ до [α-<sup>32</sup>P] АМФ и тем самым снижает скорость накопления регистрируемого продукта реакции — [α-<sup>32</sup>P] АМФ. Эти данные свидетельствуют в пользу согласованного протекания реакций деградации: АТФ → АДФ → АМФ, где продукт каждой последующей реакции тормозит реакцию, приводящую к его образованию. Как доказательство согласованного протекания АТФ-азной и АДФ-азной стадий гидролиза может служить тот факт, что добавление в среду инкубации избытка АМФ (продукта АДФ-азной стадии реакции) тормозит гидролиз АДФ, накопление которого в свою очередь приводит к торможению АТФ-азной стадии реакции.

Последовательный механизм гидролиза АТФ до АМФ под действием нуклеотидаз эндотелиальных клеток аорты был установлен также Pearson et al. [17].

Способность AppNHp и АДФβS эффективно тормозить как АТФ-азную, так и АДФ-азную активности может свидетельствовать в пользу того, что гидролиз АТФ до АДФ и гидролиз АДФ до АМФ может катализироваться одним и тем же ферментом. Более высокое сродство к АДФ (промежуточному продукту), чем к АТФ (исходному субстрату) также может свидетельствовать в пользу такого предположения.

Выявленные особенности деградации АТФ под действием легочных мембран указывают на то, что конечным продуктом гидролиза АТФ является АМФ. Увеличение времени инкубации мембран с [α-<sup>32</sup>P] АТФ до 90 мин не приводило к снижению радиоактивности в пятне [α-<sup>32</sup>P] АМФ, что могло бы указывать на гидролиз [α-<sup>32</sup>P] АМФ до аденозина (данные не представлены). Это согласуется с данными Chellian et al. [6], полученными при изучении гидролиза аденило-

вых нуклеотидов изолированными легкими. Однако, по данным Ryan et al. [22], а также Pearson et al. [18], в мембранах культивируемых эндотелиальных и гладкомышечных клеток гидролиз АТФ может завершаться образованием аденозина. Как было замечено некоторыми исследователями [7, 11], степень 5'-нуклеотидазной активности, обеспечивающей гидролиз АМФ до аденозина, может меняться при культивировании клеток, что, возможно, связано с изменением уровня экспрессии фермента или с существенным изменением его сродства к субстрату.

Известно, что в катаболизме циркулирующих в кровяном русле адениловых нуклеотидов помимо эктонуклеотидаз (АТФ-азы, АДФ-азы, 5'-нуклеотидазы) могут принимать участие и другие эндотелиальные эктоферменты — нуклеозиддифосфаткиназа, пирофосфатаза и дезаминаза [20]. Следовательно, концентрация циркулирующих в крови АТФ и продуктов его деградации может определяться согласованной работой мембранных нуклеотидаз, ферментов внутриклеточного метаболизма адениловых нуклеотидов, а также систем, обеспечивающих транспорт АТФ и его метаболитов через плазматическую мембрану. Кроме того, метаболизм адениловых нуклеотидов может подвергаться изменениям при различных патологических процессах, например при гипоксии [8].

В заключение следует отметить, что наличие ансамблей ферментов, метаболизирующих адениловые нуклеотиды снаружи и внутри клетки, предполагает существование взаимосвязи данных ферментативных систем с АТФ-зависимыми процессами в клетке. Возможность такой предполагаемой взаимосвязи представляет интерес и требует дальнейшего исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Е. А., Панченко М. В., Виноградов А. Д. // Биохимия. — 1989. — Т. 54. — С. 1490—1498.
2. Antonov A. S., Nicolaeva M. A., Klueva T. S., Romanov Yu. A., Babaev V. R., Bystrevskaya V. B., Perov N. A., Repin V. S., Smirnov V. N. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 83. — P. 1—19.
3. Antonov A. S., Lukasev M. E., Romanov Yu. A., Tkachuk V. A., Repin V. S., Smirnov V. N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 9704—9708.
4. Berne R. M., Foley D. H., Watkinson W. P., Miller W. L., Winn R., Rubio R. // Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides // Eds. H. P. Baer, J. I. Drummond. — New York: Raven Press, 1979. — P. 117—126.
5. Chance B., Nishimura M. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 641—650.
6. Chellian R., Bakhle Y. S. // Q. J. Exp. Physiol. — 1983. — Vol. 68. — P. 289—300.
7. Chesterman C. N., Ager A., Gordon J. L. // J. Cell. Physiol. — 1983. — Vol. 116. — P. 45—50.
8. Clemens M. G., Forrester T. // J. Physiol. (Lond). — 1981. — Vol. 312. — P. 143—158.
9. Crutchley D. J., Eling T. E., Anderson M. W. // Life Sci. — 1978. — Vol. 22. — P. 1413—1420.
10. Cusack N. Y., Pearson J. D., Gordon J. L. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 214. — P. 975—981.

11. Hayes L. W., Goguen C. F., Stevens A. L., Margargal W. W., Slakey L. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 2532—2535.
12. Hellewell P. G., Pearson J. D. // Pulmonary Endothelium in Health and Disease / Ed. U. S. Ryan.— New York, 1987.— P. 327—348.
13. Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G., Minick C. R. // J. Clin. Invest.— 1973.— Vol. 52.— P. 2745—2756.
14. Maack T., Suzuki M., Almeida F. A., Nusseneweig D., Scarboro R., McEnroc G. A., Lewitski J. A. // Science.— 1987.— Vol. 238.— P. 675—678.
15. Maciag T., Cerundo J., Ilsley S., Kelly P. R., Forand R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 5674—5676.
16. Nupenko E. V., Panchenko M. P., Starikova M. G., Grishin A. V., Trachuk V. A. // Biochim. Biophys. Acta.— 1991.— Vol. 1091.— P. 213—221.
17. Pearson J. D., Gordon J. L. // Biology of Endothelial Cells / Ed. E. A. Jaffe.— Boston: Martinus Nijhoff Publ, 1974.— P. 331—342.
18. Pearson J. D., Gordon J. L. // Nature.— 1979.— Vol. 981.— P. 384—386.
19. Pearson J. D., Carleton J. S., Gordon J. L. // Biochem. J.— 1980.— Vol. 190.— P. 421—429.
20. Pearson J. D., Gordon J. L. // Annu. Rev. Physiol.— 1985.— Vol. 47.— P. 617—627.
21. Peterson G. L. // Anal. Biochem.— 1977.— Vol. 83.— P. 346—356.
22. Ryan J. W., Roblero J., Steward J. M. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 110.— P. 795—797.

Поступила 19.03.92.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.233-002.2-07:616.15-07

*М. Н. Воробьева, Г. В. Трубников*

## ЦИРКАДИАНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИТОМ

Кафедра факультетской терапии Алтайского медицинского института

### CIRCADIAN CHANGES OF BLOOD MICRORHEOLOGICAL PROPERTIES IN CHRONIC BRONCHITIS PATIENTS

*M. N. Vorobjeva, G. V. Trubnikov.*

#### Summary

Studies of circadian rhythmicity blood microrheological parameters (erythrocytes deformability and agregability) and relative plasma viscosity in COPD patients with different degree of respiratory insufficiency and healthy subjects have been carried out. The presence of distinctive circadian rhythmicity of noted values changes both in patients and healthy subjects was determined. Microrheological values biological rhythm disorders creating critical situation for microcirculation at night and early morning hours in COPD patients grew progressively worse while intensifying of respiratory insufficiency clinical manifestation.

#### Резюме

Проводили исследования циркадных ритмов (ЦР) микрореологических параметров крови (агрегантной способности и формы эритроцитов) у больных хроническим обструктивным бронхитом с различной степенью дыхательной недостаточности (ДН). Такие же исследования выполнили в группе здоровых лиц. Выявили наличие четких ЦР вышеозначенных параметров в обеих группах. По мере усиления ДН у больных хроническим обструктивным бронхитом увеличивались и выраженные расстройства микроциркуляции в ночные и ранние утренние часы.

Актуальность системного биоритмологического подхода к исследованию патогенеза заболеваний диктуется доказанной вариабельностью клинических проявлений патологии в течение суток [5, 6]. На основании параметра времени в физиологии пересматриваются значения «нормальных величин» [3], исследуются особенности функционирования органов и систем не только в пространстве, но и во времени. Доказано, что на протяжении суток существует волновой процесс, обеспечивающий не столько гомеостаз, сколько

ритмостаз функционирующих систем организма [22]. Проявление различных патологических процессов происходит в большинстве случаев именно в те временные моменты, когда наблюдаются крайние отклонения в показателях физиологических функций организма на протяжении суток. Следовательно, изменение циркадианной организации функций (десинхроноз) следует рассматривать как обязательный компонент общего адаптационного синдрома, являющегося, как правило, первым проявлением патологии [5].