

Вплив антимембранних тестикулярних антитіл на активність Na^+ , K^+ -АТФази у тестикулах щурів різного віку

Изучали влияние кроличьих антител, специфических к плазматическим мембранам клеток тестикул в опытах на крысах линии Вистар трех возрастных групп (неполовозрелые — 20 сут жизни, половозрелые — 5—7 мес и старые — 24—26 мес). Установлено, что прединкубация фракции плазматических мембран с иммуноглобулином G, выделенным из антимембранной тестикулярной цитотоксической сыворотки (Ig G-АТЦСм в большой дозе: 50 мкг белка G на 125 мкг белка фракции мембран), приводит к статистически достоверному угнетению активности Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах клеток тестикул половозрелых и старых крыс. У неполовозрелых крыс отмечалась лишь тенденция к снижению активности этого фермента. Инкубация плазматических мембран клеток тестикул крыс разного возраста с малыми дозами Ig G-АТЦСм (0,50 мкг белка на 125 мкг белка мембран) вызывала статистически достоверное повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы у половозрелых и старых животных и незначительное ее повышение у неполовозрелых крыс. Фракция Ig G, выделенная из нормальной кроличьей сыворотки (Ig G-НКС), оказывала менее выраженное влияние на активность Na^+ , K^+ -АТФазы при сохранении тенденции к снижению активности под влиянием больших доз препарата и её повышению при введении малых доз.

Вступ

При деяких захворюваннях статевих залоз у чоловіків в сироватці крові виявляються антитіла до сперматозоїдів та до тканини тестикул [8, 10, 13, 15], що дозволяє припустити їх участь у патогенезі чоловічого беспліддя.

В експерименті на тваринах показано, що внутрішньовенне введення великих доз антитестикулярної цитотоксичної сироватки (АТЦС) призводило до порушень структури і функції тестикул статевозрілих щурів, у той час як введення малих доз старим тваринам здійснювало реактивуючу дію на тестикули [1].

У плані вивчення механізму дії антитестикулярних антитіл вважається важливим вивчення процесів, що відбуваються на мембранах клітин під впливом специфічних антитіл. Особливий інтерес викликає визначення змін активності мембранного ферменту Na^+ , K^+ -АТФази, тому що саме цьому універсальному ферменту, який забезпечує трансмембранний транспорт іонів Na та K , відводиться значна роль у багатьох етапах репродуктивної функції [9, 18].

Метою нашої роботи було визначення активності Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран клітин тестикул нестатевозрілих, статевозрілих та старих щурів, а також вивчення впливу різної кількості антимембранних тестикулярних антитіл на активність ферменту у щурів різного віку.

Методика

Антимембранну тестикулярну цитотоксичну сироватку (АТЦСм) специфічну для щурів, одержували шляхом імунізації кролів породи Шиншила ізольованими плазматичними мембранами клітин тестикул статевозрілих щурів вагою 200-250 г. Плазматичні мембрани виділяли методом диференціального центрифугування у градієнті щільності сахарози [6, 12,

16]. Чистоту
електронно
дом гел-ф
G-АТЦСм)
комплемен

Вивче
клітин тес
тевозрілих
суспензії м
трольних
нормальни
лих дозах
мембран.

В гру
K⁺- АТФа
різні строи
ких доз (2
внаслідок
редовище,
NaCl — 1
додавали
об'єм реак
гом 15 хв
ли при н
пиняли ч
за методо
вали за р
жали у н
білка виз

Результат

Одержані
клітин те
K⁺-АТФа
активніст

Мал. 1. А
тичних м
щурів різн

G-НКС
вірогідно
рих щур
стерігала

ISSN 0201

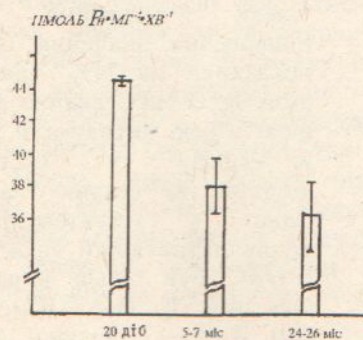
16]. Чистоту фракцій плазматичних мембран визначали за допомогою електронного мікроскопа та методом диск-електрофорезу у ПААГ. Методом гель-фільтрації на сефадексі G = 200 виділяли імуноглобулін G (Ig G-АТЦСм) із імунних сироваток з титром 1:400-1:800 у реакції зв'язування комплементу.

Вивчення активності Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах клітин тестикул щурів різного віку (нестатевозрілих — 20 діб життя, статевозрілих — 5—7 міс, старих — 24—26 міс) провадили за умов інкубації суспензії мембран з Ig G-АТЦСм протягом 5, 15 та 35 хв при 37°C. У контрольних дослідженнях використовували Ig G, який виділяли з сироватки нормальних кролів (Ig G-НКС) і брали у дослід в умовно великих та малих дозах: 50 та 0,50 мкг білка G відповідно на 125 мкг білка фракції мембран.

В групі статевозрілих щурів-самців визначали активність Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах клітин тестикул, виділених у різні строки (через 5 та 35 хв і 24 год) після одноразового введення великих доз (2 мг/100 г) ферменту у вену хвоста, за масою P_{H} , який виділявся внаслідок розщеплення АТФ за участю цього ферменту. В інкубаційне середовище, яке мало такий склад у кінцевих концентраціях (ммоль/л): NaCl — 100; KCl — 10; MgCl_2 — 3,0; АТФ — 3,0; трис- HCl — 30; pH 7,5, додавали суспензію плазматичних мембран (100-150 мкг білка); кінцевий об'єм реакційної суміші складав 1,5 мл; інкубацію проб провадили протягом 15 хв при 37°C. Активність Mg^{2+} -АТФази в реакційній суміші визначали при наявності 0,1 ммоль/л строфантину К. Реакцію гідролізу АТФ зупиняли через 10 хв 10%-вим розчином ТХУ. Кількість фосфору визначали за методом Fiske та Subbarrow [11]. Активність Na^+ , K^+ -АТФази розраховували за різницею між активностями Mg^{2+} , Na^+ , K^+ - та Mg^{2+} -АТФази, виражали у наномоль P_{H} на один міліграм білка за одну хвилину. Кількість білка визначали за методом Лоурі. Результати обробляли статистично.

Результати та їх обговорення

Одержані результати свідчать, що з віком у плазматичних мембранах клітин тестикул відбувається зниження активності ферменту Na^+ , K^+ -АТФази (мал. 1. За віссю абсцис — вік тварини, за віссю ординат — активність Na^+ , K^+ -АТФази). Цей факт пояснюють [3, 7] зменшенням числа



Мал. 1. Активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран тестикулярних клітин у щурів різного віку в нормі.

функціонуючих клітин, особливо в секреторних органах (наднирниках, щитовидній та статевих залозах). Крім того, одним із специфічних інгібіторів активного транспорту іонів, блокуючих виведення Na^+ з клітин, є холестерин, вміст якого в старості, як правило, підвищується [3, 7, 15].

В таблиці наведені результати, які свідчать про зміну активності Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах клітин тестикул щурів різного віку при інкубації їх протягом 15 хв з великими та малими дозами Ig

(АТЦСм) спе-
породи Шинши-
тестикул статевозрілих та старих щурів (на 43 та 42% відповідно). У статевозрілих тварин спостерігалася лише тенденція до зниження активності цього ферменту на

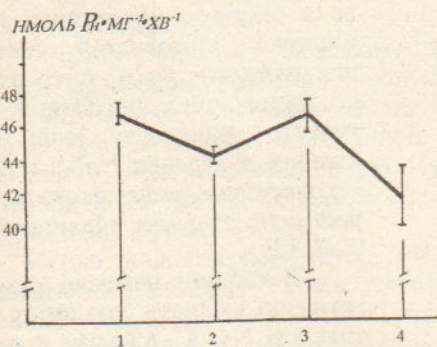
Активність Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах клітин тестикул щурів різного віку під час інкубації (15 хв) з імуноглобуліном G (Ig G), видаленим із антимембранної тестикулярної цитотоксичної сироватки (Ig-АТЦм) імунізованих кролів та із сироватки нормальних кролів (Ig G-НКС), нмоль $\text{P}_i \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$

Група тварин	Інкубація без Ig G (контроль)	Інкубація з Ig G			
		АТЦСМ		НКС	
		50 мкг	0,50 мкг	50 мкг	0,50 мкг
Нестатевозрілі щури (20 діб)					
M ±m	44,3 ±0,7	36,1 ±3,3	53,4 ±6,7	34,1 ±6,7	55,1 ±5,0
P	-	<0,2	<0,5	<0,5	<0,02
n	6	5	6	5	5
Статевозрілі щури (5—7 міс)					
M ±m	38,0 ±1,5	21,1 ±1,7	56,8 ±3,3	30,1 ±3,3	50,1 ±5,0
P	-	<0,05	<0,01	<0,2	<0,2
n	9	9	7	5	5
Старі щури (24—26 міс)					
M ±m	36,2 ±2,8	21,0 ±0,8	48,4 ±4,4	25,4 ±5,0	40,1 ±1,7
P	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,5
n	8	7	7	5	5

13%. Такі ж дози Ig G-НКС значно менше та статистично невірогідно знижували активність Na^+ , K^+ -АТФази у щурів всіх вікових груп. Слід підкреслити, що вікові відмінності активності ферменту у статевозрілих щурів при дії великих доз Ig G-АТЦсм проявлялися також у тому, що пригнічуючий ефект був практично однаковим при інкубації мембран з Ig протягом всіх вивчаємих строків (5, 15 та 35 хв). В той час, як у старих щурів через 5 хв інкубації виявлена тенденція до підвищення активності ферменту, а через 35 хв його активність не відрізнялася від такої у контролі.

Предінкубація плазматичних мембран тестикулярних клітин з малими дозами Ig G-АТЦсм викликала статистично вірогідне підвищення активності Na^+ , K^+ -АТФази у статевозрілих та старих тварин на 49 та 34% відповідно. У нестатевозрілих тварин відзначена тільки тенденція до підвищення значення цього показника на 14%. Такі ж дози Ig G-НКС значно меншою мірою активували Na^+ , K^+ -АТФазу у нестатевозрілих та старих тварин.

Однак у нестатевозрілих щурів активуючий ефект Ig G-НКС був більш виражений, ніж Ig G-АТЦсм. На мал. 2 (1 — контроль, 2 — через 5 хв, 3 — через 35 хв, 4 — через 24 год після введення Ig G-АТЦсм) наведені результати, які свідчать про зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах тестикулярних клітин, видалених у різні строки після внутрішньовенного одноразового введення великої дози Ig G-АТЦсм статевозрілим щурам. За умов цього експерименту також



Мал. 2. Активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран тестикулярних клітин у статевозрілих щурів під впливом одноразового внутрішньовенного введення великої дози (50 мкг) Ig G-АТЦсм.

K^+ -АТФази у плазматичних мембранах тестикулярних клітин, видалених у різні строки після внутрішньовенного одноразового введення великої дози Ig G-АТЦсм статевозрілим щурам. За умов цього експерименту також

спостерігалос 24 год після

Зміна : можливо, як кул ферментититіл, так і титіл, специантитіл та ртивності Na^+ підтверджуєження інактивбілків та лі17].

У наш Na^+ , K^+ -АТ із статевозріперших найзано, що зм у ході пост статевозрілі ніж у статевих антиті. АТФазою, факторів, с ферменту ханізму св тивності с Вікові особ явлені у теріалом і змінами м ході онто мембрани

Висновки

Таким чи матичних тивність залежить діяльності впливом віком тв вується) нормальн женні т імуногло

L.I. Aleksy

EFFECT O ON ACTIV

The effect testicle ce (preadoles stated that

щурів різного
ованих кролів

НКС	
	0,50 мкг
55,1 ± 5,0	
<0,02	
5	
50,1 ± 5,0	
<0,2	
5	
40,1 ± 1,7	
<0,5	
5	

гідно зни-
груп. Слід
атевозрілих
у тому, що
ембран з Ig
к у старих
активності
кої у конт-

ин з мали-
щення ак-
49 та 34%
нестате-
відзначена
ція до
ння цього
Такі ж
ачно мен-
вали Na⁺,
нестате-
х тварин.
тевозрілих
ефект Ig
вираже-
ЦСм. На
оль, 2 —
рез 35 хв,
після вве-
м) наве-
свідчать
ості Na⁺,
алених у
кої дози
у також

спостерігалось вірогідне зниження активності ферменту через 5 хв і через 24 год після введення.

Зміна активності Na⁺, K⁺-АТФази під впливом антитіл пов'язана, можливо, як із безпосередньою взаємодією антитіл, специфічних до молекул ферменту, що знаходяться у загальному пулі антимембранних антитіл, так і з структурною перебудовою мембран, пов'язаною з дією антитіл, специфічних до інших білків та ліпідів мембран. Дією нормальних антитіл та ксеногенних білків обумовлені, можливо, і незначні зміни активності Na⁺, K⁺-АТФази під впливом Ig G-НКС. Це припущення підтверджується даними з літератури про те, що білки екзогенного походження інактивують Na⁺, K⁺-АТФазу завдяки змінам гідрофобної взаємодії білків та ліпідів, мікров'язкості та інших властивостей мембран [4, 14, 15, 17].

У наших дослідженнях встановлені менш виражені зміни активності Na⁺, K⁺-АТФази під впливом антитіл у нестатевозрілих тварин порівняно із статевозрілими та старими за умов, коли вихідна активність ферменту у перших найбільш висока. Це можна пояснити деякими причинами. Показано, що зміни функціональної активності імунної та репродуктивної систем у ході постнатального онтогенезу самців відбуваються спряжено, а у нестатевозрілих тварин імунна відповідь на тимусзалежний антиген нижче, ніж у статевозрілих [5]. Можливо, у наших дослідках імунна реакція введених антитіл з антигенами плазматичних мембран та, зокрема, з Na⁺, K⁺-АТФазою, що залежить від вмісту компементу у сироватці крові та інших факторів, слабше, ніж у нестатевозрілих тварин, внаслідок чого активність ферменту змінюється значно менше. Про можливу участь такого механізму свідчить той факт, що під впливом Ig G-НКС відмінності змін активності ферменту у нестатевозрілих тварин значно менше виявлені. Вікові особливості змін активності Na⁺, K⁺-АТФази під впливом антитіл, виявлені у наших експериментах при імунізації кролів антигенним матеріалом із тестикул статевозрілих щурів, можуть бути пов'язані також із змінами молекулярної структури мембран у клітинах та їх рецепторів у ході онтогенезу [7], що призводить до вікових змін складу антигенів у мембрані та їх спорідненості до антитіл.

Висновки

Таким чином, наведені результати свідчать про те, що антитіла до плазматичних мембран тестикулярних клітин у щурів впливають на активність мембранного ферменту Na⁺, K⁺-АТФази. Характер цього впливу залежить від дози антитіл: великі дози пригнічують, а малі — активують діяльність ферменту. Вираженість змін активності Na⁺, K⁺-АТФази під впливом антитіл (як великих, так і малих доз) значною мірою пов'язана з віком тварин: значно більше вона змінюється (пригнічується чи активується) у статевозрілих та старих тварин. Імуноглобулін із сироватки нормальних кролів менше впливав на активність ферменту при збереженні тенденції до зниження активності під впливом великих доз імуноглобуліну та підвищення — при введенні малих доз.

L.I. Aleksyuk, V.S. Sukhina, T.M. Zelenskaya

EFFECT OF ANTIMEMBRANE TESTICULAR ANTIBODIES ON ACTIVITY OF Na⁺, K⁺-ATPase

The effect of large and small doses of rabbit antibodies specific to plasma membranes of the rat testicle cells has been studied in the experiments on Wistar rats of three age groups (preadolescent — aged 20 days, puberal — aged 5-7 months and old — aged 24-26 months). It is stated that incubation of plasma membranes by IgG fraction isolated from antimembrane testicular

serum (IgG-ATCSm) in a large dose (43 g of protein G per 125 g of protein of membrane fraction) caused statistically reliable inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the membranes of testicle cells of puberal and old rats. Preadolescent rats exhibit only a tendency to decrease the activity of this enzyme. Incubation of plasma membranes of testicle cells in rats of different age by small doses of IgG-ATCSm (0.43 g of protein G per 125 g of membrane protein) induced a statistically reliable increase of Na^+ , K^+ -ATPase activity in puberal and old animals and its slight increase in preadolescent rats. The IgG fraction isolated from normal rabbit serum (IgG-NRS) exerted a less pronounced effect on Na^+ , K^+ -ATPase activity parallel with retention of a tendency to a decrease of activity under the influence of large doses of the drug and to an increase with introduction of small doses.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зеленская Т. М. Эндокринные взаимоотношения и тестикулярные антитела. — Киев: Наук. думка, 1981. — 145 с.
2. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Кинетические свойства мембраносвязанных ферментов // Укр. биохим. журн. — 1977. — 40, N1. — С. 116-117.
3. Лэмб М. Биология старения. — М.: Мир, 1980. — 206 с.
4. Митина Т. В., Луцк М. Д., Кириченко Н. Л. Ферментные процессы в ткани семенников при адьювантном артрите. — Харьков, 1979. — С. 158-159.
5. Никоненко И. Р. Роль андрогенов в регуляции иммунного ответа у самцов в онтогенезе: Автореф. дис. канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 18 с.
6. Рейхерт Л., Абу-Исса Х. Свойства рецепторов ФСГ в ткани гонад крыс // Взаимодействие гормонов и рецепторов. — М.: Мир, 1979. — С. 103-167.
7. Фролькис В. В. Генно-регуляторная гипотеза старения // Генетические механизмы старения и долголетия. — Киев, 1977. — С. 7-18.
8. Чернышев В. П. Антиспермальные аутоантитела и изменения в субпопуляции Т-лимфоцитов при мужском бесплодии // Врачеб. дело — 1978. — N7. — С. 93-97.
9. Ahmed R., Williams-Ashman H. Studies on the sodium plus potassium ionstimulated adenosine triphosphatase system in rat ventral prostate // Biochem. J. — 1969. — 113. P. 829-835.
10. Azim-Aida Abdel, Fayand Sawsan, Fattah Aly Abdel, Habeib Mohamed. Immunologic studies of male infertility // Fertil. and Steril. — 1978. — 30, N4. — P. 426-429.
11. Fiske C., Subbarow J. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. — 1925. — 66/1, — P. 375-400.
12. Hemminki K., Suovaniemi O. Preparation of plasma membranes from isolated cells of newborn rat brain // Biochim. et biophys. Acta. — 1973. — 298. — P. 75-83.
13. Johnson M. H., Hekman A., Rumke Ph. The male and female genital tracts in allergic disease. // Clin. aspects of immunology. 3, rd. — 1975. — P. 1509-1544.
14. Jones I. T., Andrews S. J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in somatic and germinal cells of the mouse testis // J. Reprod. and Fert. — 1978. — 54, N2. — P. 357-362.
15. Means A. R., Huckins C. Hormone Binding and Target cell activation in the Testis. — New York: Acad. Press, 1974. — 145 p.
16. Nevil D. M. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver // J. Biophys. Biochem. Citol. — 1960. — 8, N2. — P. 413-419.
17. Stambaugh R. Enzymatic and morphological event in mammalian fertilization // Gamete Res. — 1978. — 1, N4. — P. 65-85.
18. Vacquier V. D., Moy G.W. Stoichiometry of phosphate loss from sea urchin sperm guanylate cyclase during fertilization // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1986. — 137, N3. — P. 1148-1152.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 24.03.92