



УДК 577.153.3:612.843+617.735—02.156

СВОЙСТВА 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ СЕТЧАТКИ
ПРИ ЕЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ У КРЫС

ОСТАПЕНКО И. А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

Показано, что активность 5'-нуклеотидазы (5-НД) сетчатки у крыс линии Wistar, возрастая в процессе постнатального развития, достигает максимального значения на 8—10-й день развития (400—500 нмоль P_i /мг белка/мин), после чего она уменьшается в несколько раз в течение последующих 2-х недель, достигая постоянного уровня (120 нмоль P_i /мг белка/мин). У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (линия Campbell) закономерность изменения 5-НД активности в процессе онтогенеза была такой же, как у крыс линии Wistar. Однако, начиная с 6—7-го дня жизни, активность фермента сетчатки больных крыс на 30—40% была ниже, чем у здоровых. Это наблюдали не только в общей мембранной фракции всей сетчатки, но и в субфракциях плазматических мембран фоторецепторных и нефоторецепторных клеток.

5-НД активность сетчатки белых и здоровых крыс не менялась под действием трипсина и в равной степени (на 40—50%) снижалась при воздействии конканавалина А. ДОХ-На (0,5—0,75%) активировал 5-НД сетчатки больных животных в большей степени, чем здоровых (на 65 и 40% соответственно). Эти различия были обнаружены у 30-дневных животных и отсутствовали у 8—10-дневных крыс.

Ранее было показано, что у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (линия Campbell) активность 5'-нуклеотидазы (К. Ф. 3. 1. 3. 5.) в ней значительно снижена по сравнению со здоровыми животными [1]. Эти отличия проявлялись уже в относительно ранние сроки постнатального развития, то есть до окончания формирования фоторецепторных мембран сетчатки. Причина обнаруженных изменений активности 5-НД оставалась неясной.

5-НД локализована обычно в плазматических мембранах (ПМ) клеток, хотя в некоторых тканях обнаружена и в водорастворимой фракции [2—5]. 5-НД—липидзависимый фермент: под действием некоторых детергентов наблюдали его активацию [7, 8], при солиubilизации и очистке фермент обогащался сфингомиелином, удаление которого снижало его устойчивость фермента к тепловой денатурации [6, 7]. Гомогенная по данным электрофореза 5-НД из ПМ печени содержала 300 молекул фосфолипидов на молекулу белка [8]. 5-НД

является гликопротеидом и ингибируется различными лектинами, в частности конканавалином А [5, 9, 10].

Целью настоящей работы было уточнение динамики изменений активности 5-НД сетчатки у здоровых и больных крыс, начиная с первых дней постнатальной жизни, обнаружение отличий в свойствах 5-НД мембран сетчатки больных животных по сравнению со здоровыми, а также выяснение вопроса, мембраны каких клеток (фоторецепторных, нефоторецепторных) характеризуются изменениями активности 5-НД. В связи с поставленными задачами исследовалось влияние на активность 5-НД сетчатки различных агентов, способных модифицировать активность фермента. Для этого были использованы ДОХ-На, воздействующий на липидное окружение фермента, конканавалин А, взаимодействующий с углеводными компонентами ПМ, и трипсин, модифицирующий белки ПМ; были применены методы субфракционирования для выяснения вопроса о степени изменений активности 5-НД разных фракций сетчатки у больных животных по сравнению со здоровыми.

Материалы и методы

Работа была выполнена на крысах линии Campbell с наследственной дегенерацией сетчатки и контрольных крысах линии Wistar в возрасте 2—68 дней. Исследовали общую фракцию мембран сетчатки, полученную после центрифугирования гомогената (12000 g, 20 мин), и отдельные фракции, выделенные после центрифугирования гомогената 30 сетчаток в градиенте плотности сахарозы, как описано в работе Stone и соавт. [11]. Содержание родонина и чистоту фракций определяли, как описано ранее [12]. Активность 5-НД и количество белка оценивали как в работе Чусовой и соавт. [1]. Трипсин («Reanal», Венгрия) использовали в количестве 0,1—1,0 мг/мг белка мембранной фракции, преникубируя пробы в течение 2—30 мин при 20° или 37°, добавляя затем ингибитор трипсина в концентрации, в 3 раза превышающей количество протеолитического фермента. Конканавалин А («Serva», ФРГ) применяли в концентрации 5 мкг/мл инкубационной среды, подвергая пробы инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре, затем промывали осадок мембран 3 раза 10 mM трис-буфером pH 7,4. ДОХ-На использовали в различных концентрациях, преникубируя пробы при комнатной температуре в течение 10 мин.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов исследовали активность 5-НД общей мембранной фракции сетчатки здоровых и больных крыс в течение первых 2-х месяцев постнатального развития, начиная со 2-го дня жизни. У здоровых животных со 2-го по 8-й день происходило резкое увеличение активности 5-НД (в 17 раз). После этого наблюдалось быстрое падение ферментативной активности (на 10—15-й день жизни) с последующим более плавным снижением активности 5-НД и ее выходом на постоянный уровень примерно с 40—45-го дня постнатального развития (рис. 1). Такое наличие максимума ферментативной активности в сетчатке позвоночных в первые дни постнатального развития

характерно и для некоторых других ферментов, например, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы [13] и, по-видимому, связано с активными процессами дифференцировки клеток сетчатки в этот период жизни. Изменение активности 5-НД в процессе развития животных описано и для других тканей, например, печени [14].

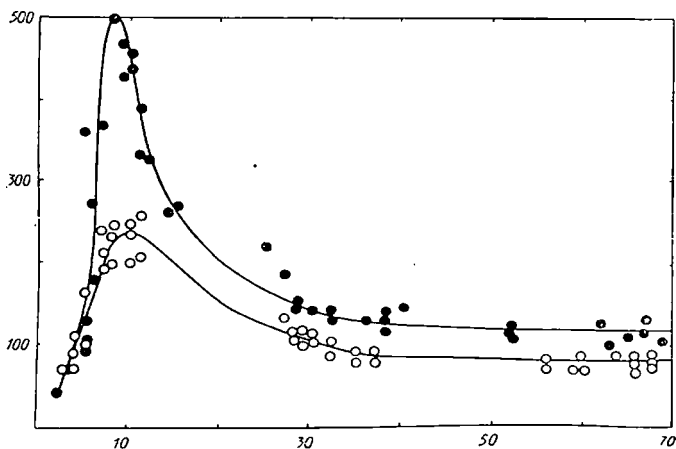


Рис. 1. Активность 5'-нуклеотидазы в сетчатке крыс линий Wistar (●) и Campbell (○) в процессе постнатального развития. По оси абсцисс—дни постнатального развития. По оси ординат—активность фермента (нмоль P_i /мг белка/мин)

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки активность 5-НД оказалась достоверно ниже на всем протяжении изученного срока, начиная с 6—7-го дня жизни. В первые 5 дней активность 5-НД у обеих линий крыс была примерно равна, а затем у крыс линии Campbell значительно снижалась; при этом зависимость активности 5-НД от сроков постнатального развития у больных крыс была такой же, как у здоровых (ярко выраженный максимум на 8—10-й день постнатального развития). На 10-й день активность 5-НД в сетчатках крыс линии Wistar была в 2 раза, а на 30—60-й день почти в 1,5 раза выше, чем у крыс линии Campbell (рис. 1).

Различия в активности 5-НД между больными и здоровыми животными сохранялись и в субфракциях мембран сетчатки. Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что активность 5-НД у крыс линии Campbell ниже, чем у крыс линии Wistar, как во фракциях (1 и 2) фоторецепторных мембран, так и в мембранах, полученных из нефоторецепторных слоев сетчатки (3 и 4 фракции). Наибольшее снижение активности фермента у больных крыс по сравнению со здоровыми было во 2-й фракции, содержащей как наружные, так и внутренние сегменты фоторецепторных клеток и обладающей наиболь-

шей У. А. 5-НД. Этот факт согласуется с результатами исследований Shichi и Somers [15]. Полученные данные свидетельствуют об изменении фоторецепторных и нефоторецепторных ПМ сетчатки и подтверждают постулированное ранее предположение о поражении при пигментном ретините не только фоторецепторных, но и других мембранных структур сетчатки [1].

Таблица 1

Распределение удельной активности 5'-нуклеотидазы по субфракциям сетчатки крыс линии Wistar и Campbell

№ фракции	% сахарозы*	Wistar		Campbell		
		Относительное содержание родонина **	У. А. 5'-нуклеотидазы (нмоль Р _i /мг белка/мин)	Относительное содержание родонина **	У. А. 5'-нуклеотидазы (нмоль Р _i /мг белка/мин)	% снижения активности по сравнению с контролем
1	30,5—33	45	238±26	42	178±21	—25
2	33—35,5	11	470±35	18	212±11	—55
3	35,5—38	5	266±21	7	200±13	—24
4	>38	0	157±12	0	140±9	—11

Примечание. * концентрация растворов сахарозы, между которыми располагались фракции мембран сетчатки. ** процентное содержание родонина к содержанию белка во фракции.

В следующих сериях опытов было изучено действие трипсина, конканавалина А и ДОХ-На на активность 5-НД общей мембранной фракции сетчатки больных и здоровых крыс (табл. 2). Оказалось, что трипсин в концентрации 0,1—1,0 мг/мг белка сетчатки не оказывал заметного действия на активность этого фермента, что не совпадает с его выраженным действием на 5-НД ПМ печени [8].

Таблица 2

Влияние различных агентов на активность 5'-нуклеотидазы сетчатки крыс линий Wistar и Campbell.

Условия опыта	Изменение активности 5'-нуклеотидазы (в %)	
	Wistar	Campbell
Трипсин	0(7)	0(7)
Конканавалин А	—50±3(12)	—43±4(10)
ДОХ-На (0,5%)	+40±3(17)	+66±5(16)

Примечание. В скобках указано количество опытов.

Ранее было показано, что мембраны обломков наружных сегментов палочек и отростков пигментного эпителия здоровых и больных крыс резко отличаются по связыванию лектинов [16, 17]. В то же время именно 5-НД может быть одним из гликопротеидов мембран, взаимодействующих с лектинами [2]. Оказалось, что степень торможения конканавалином А активности 5-НД сетчатки у крыс линии Campbell и линии Wistar была одинаковой и составляла в среднем 40—50% (табл. 2); иными словами, в этих опытах не удалось обнару-

жить различий в свойствах изучаемого фермента у больных и здоровых крыс.

При исследовании действия ДОХ-Na на 5-НД сетчатки были выявлены различия в свойствах фермента у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки и здоровых. ДОХ-Na в зависимости от концентрации вызывал различную активацию фермента сетчатки здоровых крыс (от 25 до 70%) (рис. 2). Повышение концентрации ДОХ-Na выше 0,75—1,0% не приводило к дальнейшему повышению активности 5-НД, а при 1,5%-ной концентрации детергента уже наблюдалось незначительное снижение активации фермента. Поэтому в дальнейшем при сравнительном изучении свойств 5-НД сетчаток больных и здоровых крыс использовали 0,5—0,75%-ный ДОХ-Na.

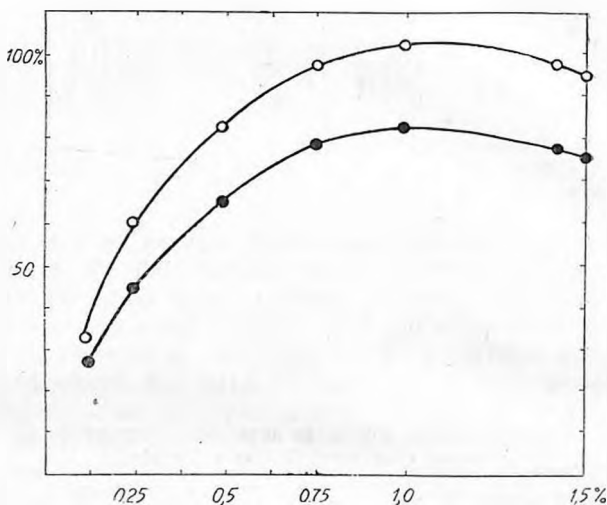


Рис. 2. 5'-нуклеотидазная активность сетчатки 30-дневных крыс линий Wistar (●) и Campbell (○) в присутствии различных концентраций ДОХ-Na. По оси абсцисс — концентрация ДОХ-Na (%). По оси ординат — активация фермента (%).

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (30-дневные животные) ДОХ-Na при всех использованных концентрациях вызывал значительно большее увеличение активности фермента, чем у здоровых (рис. 2). Эти различия были подтверждены при изучении действия ДОХ-Na на 5-НД активность субфракций ПМ сетчатки (рис. 3). Оказалось, что и у больных, и у здоровых крыс ДОХ-Na активировал 5-НД как фоторецепторных мембран, содержащих родопсин, так и ПМ, не содержащих зрительный пигмент; при этом степень активации 5-НД фракций ПМ сетчатки у больных крыс была более высокая, чем у здоровых (рис. 3), что совпадает с отличиями, обнаруженными в общей мембранной фракции сетчатки. Интересно, что различия в

активации ДОХ-На 5-НД были выявлены только у одномесячных животных, то есть когда закончено формирование наружных сегментов фоторецепторных клеток. Для 8—10-дневных, еще слепых крыс отличий в степени активации ДОХ-На не наблюдали (рис. 3, б). Чтобы исключить возможность того, что активация ДОХ-На и выявленные в этом отношении отличия между 5-НД сетчатки больных и здоровых крыс не были проявлением увеличения доступности 5-НД для субстрата вследствие размыкания замкнутых везикул из ПМ, изучаемые фракции подвергали многократному замораживанию и размораживанию. Такая обработка приводила к потере способности ПМ образовывать

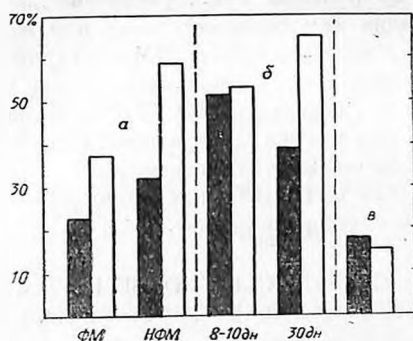


Рис. 3. Влияние ДОХ-На (0,5%) и замораживания на активность 5'-нуклеотидазы сетчатки и ее субфракций у крыс линий Wistar (■) и Campbell (□). По оси ординат—активирование фермента (%). а—влияние ДОХ-На на активность фермента в субфракциях сетчатки 30-дневных крыс: ФМ—субфракция фоторецепторных мембран; НФМ—субфракция нефоторецепторных мембран. б—влияние ДОХ-На на активность фермента в сетчатке крыс в различные сроки постнатального развития. в—влияние 3-кратного замораживания и оттаивания на активность фермента в сетчатке 30-дневных крыс.

замкнутые везикулы и некоторому увеличению активности 5-НД. Однако больные крысы по степени активации 5-НД сетчатки после замораживания и оттаивания не отличались от здоровых, и сама степень активации была значительно ниже, чем под действием ДОХ-На (рис. 3, в).

Активация 5-НД ПМ под действием ДОХ-На, наблюдавшаяся нами в отношении сетчатки, и другими авторами в исследованиях, проводимых на различных объектах [8], могла быть вызвана, с одной стороны, предотвращением агрегации молекул фермента и появлением его только в мономерной более активной форме [18]. Нельзя также исключить возможности, что вследствие солиubilизации детергентом ПМ и удаления части липидов и белков из непосредственного микроокружения 5-НД происходит изменение конформации 5-НД и активности фермента. Возможно, что отличия между больными и здоровыми

ми крысами в степени активации 5-НД под действием ДОХ-На были обусловлены отличиями в липидном составе ПМ сетчатки, так как после действия ДОХ-На, когда многие липидные компоненты удалены из непосредственного микроокружения фермента, в ряде экспериментов активность 5-НД сетчатки больных крыс становилась такой же, как у здоровых. Более сильная активация 5-НД под действием ДОХ-На в сетчатке больных крыс по сравнению со здоровыми может свидетельствовать о большей, чем у крыс линии Wistar ригидности ПМ сетчатки крыс линии Campbell. Повышенная ригидность может быть следствием избыточного присутствия какого-то липидного компонента в ПМ сетчатки больных крыс, увеличивающего вязкость ПМ (например, холестерина или сфингомиелина) или же недостатком липидного компонента, разжижающего ПМ—(например, снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот или уровня перекисного окисления липидов в сетчатке) [19]. Такие различия в ригидности ПМ могут исчезать или уменьшаться в присутствии детергента. Задачей дальнейших исследований будет выяснение природы различий в активности и свойствах 5-НД сетчатки здоровых и больных (наследственная дегенерация сетчатки) крыс.

PROPERTIES OF 5'-NUCLEOTIDASE IN THE NORMAL AND DYSTROPHIC RAT RETINA

OSTAPENKO I. A.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

The activity of 5'-nucleotidase in the retina of Wistar rats is maximal on the 8—10th day of postnatal development (400—500 nmol Pi/mg/min), during the next 2 weeks it drops reaching permanent level (120 nmol Pi/mg/min). In rats with congenital degeneration of retina (Campbell strain) the same dynamics has been described. But since the 5—6th days of life the activity of 5'-nucleotidase was for 30—40% lower in animals of Campbell strain (both in the total membrane fraction of retina and in the subfractions of plasmatic membranes).

Trypsin didn't change the activity of enzyme and concanavalin A diminished it for 40—50% in both types of animals. Deoxycholate (0,5—0,75%) activated the enzyme in Campbell rats retina for 65%, in Wistars—for 40%. These differences have been detected in 30 day-old animals but not in 8—10 day old ones.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чусова Г. Г., Остапенко И. А., Этингер Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 9, с. 305—307, 1981.
2. Дмитренко Н. П. Укр. биохим. журн., т. 53, № 1, с. 114—123, 1981.

3. Phillips E., Newshole E. A. J. Neurochem., v. 33, № 2, p. 553—558, 1979.
4. Stanley K. K., Edwards M. R., Lusio J. P. Biochem. J., v. 186, № 1, p. 59—69, 1980.
5. Fukut H., Shichi H. Arch. Biochim. and Biophys., v. 212, № 1, p. 78—87, 1981.
6. Widneil C. C.—In: Methods in Enzymol., v. 32, p. 368—374, (ed. by Colowick S. P., Kaplan N. O.), Acad. Press, 1974.
7. Merisko E. M. J. Biol. Chem., v. 256, № 4, p. 1983—1993, 1981.
8. Nakamura S. Biochim. et Biophys. Acta, v. 426, № 2, p. 339—347, 1976.
9. Dornand J., Bonnafous J. C., Mani J. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 82, № 2, p. 685—692, 1978.
10. Lamers J. M., Heyliger C. E., Panagia V., Dhallia N. S. Biochim. et biophys. acta, v. 742, № 3, p. 568—575, 1983.
11. Stone W. L., Farnsworth C. C., Dratz E. A. Exp. Eye Res., v. 28, № 4, 387—397, 1979.
12. Говардовский В. Н., Остапенко Н. А., Шабанова М. Е., Фукс Б. Б., Этингер Р. Н. Нейрофизиология, т. 9, № 5, с. 527—531, 1977.
13. Bonavita V.—In: Biochemistry of the retina (ed. by Graymore C. N.), p. 5—13, Acad. Press, L—N. Y., 1965.
14. Agnisola C. Mechanism Ageing Develop., v. 13, № 3, p. 227—239, 1980.
15. Shichi H., Somers R. L. Photochem. Photobiol., v. 32, № 3, p. 491—495, 1980.
16. Hall M. O., Nir J. Exp. Eye Res., v. 22, № 5, p. 469—476, 1976.
17. McLaughlin B. J., Wood J. G. Invest. Ophthalm., v. 19, № 7, 728—742, 1980.
18. Doss R. C., Carraway C. A., Carraway K. L. Biochim. et biophys. acta, v. 570, № 1, p. 96—106, 1979.
19. Organisciak D. T., Wang H., Kou A. L. Exp. Eye Res., v. 34, № 3, 401—412, 1982.

Поступила 30. VII. 1984