

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1990

Том 36 выпуск 2

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoi khimii

*ISSN 0042-8809*

1990

Volume 36 issue 2

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

кривая характеризует стимуляцию нейтрофилов микрочастицами в отсутствие опсонина. Добавление в суспензию фибронектина в концентрации от 12 до 50 мкг/мл вызывает значительное усиление ХЛ (более чем в 4 раза) по сравнению с контролем. Хотя абсолютные значения максимальной ХЛ и время его достижения варьировали из опыта в опыт (ответ нейтрофилов, по-видимому, зависит от их состояния), характер зависимости сохраняется.

Влияние препаратов фибронектина, денатурированных теплом, на ХЛ нейтрофилов представлено на рис. 2. Как видно, при тепловой денатурации происходит снижение степени активации нейтрофилов в тесте люминолзависимой ХЛ. Кроме того, препараты фибронектина, прогретые при 58 °С 30 и 60 мин, снижают способность агрегировать желатинизированные микрочастицы до 30 и 13 % по сравнению с нативным препаратом. Препарат фибронектина, прогретый при 60 °С в течение 1 ч, проявляет желатинагрегирующую активность менее 3 % по сравнению с нативным препаратом. В тесте люминолзависимой ХЛ этот препарат оказывает незначительное влияние на стимуляцию ХЛ, близкую к таковой в контроле.

Препарат фибронектина, инкубированный с трипсин-целлюлозой, проявляет нулевую желатинагрегирующую активность и не влияет на люминолзависимую ХЛ нейтрофилов.

Препарат фибронектина, восстановленный β-меркаптоэтанолом, также не проявляет активности в тесте агрегации желатинизированных микрочастиц и не влияет на люминолзависимую ХЛ.

Таким образом, из полученных нами результатов следует, что влияние фибронектина на ХЛ нейтрофилов зависит от сохранения нативности его молекулы, о чем свидетельствуют данные о желатинсвязывающей способности.

Очевидно, как целая молекула фибронектина, так и ее фрагменты, содержащие неразрушенные домены, способны связываться с одноименными рецепторами на клетках. Однако для активации клеток необходимо сохранение нативной структуры фибронектина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аффинная хроматография: Методы: Пер. с англ.— М., 1988.
2. Зинкевич О. Д., Литвинов Р. И., Куравская М. С., Мухутдинова Р. Г. // Способ определения концентрации фибронектина в растворе. А. с. 984305 СССР.
3. Сафина Н. А., Середкин С. М., Харрасов А. Ф., Зинкевич О. Д. // Инфекционная аллергия и иммунитет.— Казань, 1986.— С. 110—113.
4. Douglas D., Grinell F. // Cell Biol.— 1983.— Vol. 97, N 5.— P. 1515—1523.
5. Gudevicz P. W., Molnar J., Lai M. Z. et al. // Ibid.— 1980.— Vol. 87, N 2.— P. 427—433.
6. Gudevicz P. W., Beezhold D. H., Van Allen P., Molnar J. // Res. J. Reticuloendoth. Soc.— 1982.— Vol. 32, N 2.— P. 143—154.
7. Jauperaa T., Johnson E. // Scand. J. Immunol.— 1984.— Vol. 20, N 1.— P. 35—42.
8. Proctor R. A., Prendengast E., Mosher D. F. // Blood.— 1982.— Vol. 59, N 4.— P. 681—687.
9. Török J., Marlicsek J., Cseh K. et al. // Ann. Immunol. hung.— 1986.— Vol. 26, N 2.— P. 679—685.

Поступила 17.02.89

#### EFFECT OF FIBRONECTIN ON CHEMILUMINESCENCE OF NEUTROPHILS

O. D. Zinkevich, N. A. Saphina, A. F. Kharrasov, A. Ch. Myneazova

Laboratory of Immunology and Biochemistry, Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan.

Effect of some fibronectin preparations on luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils was studied. These fibronectin preparations were obtained after heat denaturation and tryptic digestion. Native fibronectin cause aggregation of gelatin-coated particles and dose-dependent promotion of chemiluminescence of neutrophils, while the rate of these reactions was distinctly decreased if the heat denaturated preparations of fibronectin were used. Structural integrity of fibronectin molecule appears to be responsible for promotion of the neutrophil chemiluminescence.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.173.1.015.31:546.411.014.49:613.863

Ф. З. Меерсон, Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко

#### АДАПТАЦИЯ К КРАТКОВРЕМЕННЫМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ УВЕЛИЧИВАЕТ АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЕВОГО НАСОСА САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И СНИЖАЕТ СКОРОСТЬ ЕГО ИНАКТИВАЦИИ ПРИ АВТОЛИЗЕ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Известно, что интенсивный и длительный стресс вызывает снижение порога фибрилляции сердца [12], постстрессорную ригидность миокарда [3] и увеличивает зависимость функции изолированного сердца от концентрации  $Ca^{2+}$  в перфузате [25]. Одновременно происходит снижение активности Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума (СПР) [11], а при цитологическом исследовании выявляется избыток  $Ca^{2+}$  в саркоплазме кардиомиоцитов [22]. Этот комплекс сдвигов свидетельствует о нарушении кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов при стрессорном повреждении и может быть предупрежден с помощью предварительной адаптации к повторным кратковременным стрессорным воздействиям [10]. В последние годы выяснилось, что такая адаптация предупреждает также снижение порога фибрилляции сердца, его эктопическую активность и депрессию сократительной функции при остром инфаркте миокарда [14], постинфарктном кардиосклерозе [13] и значительно ограничивает аритмии при острой ишемии и реперфузии сердца [10]. Существенно, что этот последний антиаритмический эффект наблюдается не только в условиях целостного организма, но сохраняется при воспроизведении ишемии и последующей реперфузии на изолированном сердце адаптированных животных [17]. Установлено также, что при определенных условиях адаптация к коротким стрессорным неповреждающим эффектам ограничивает аритмогенное и контрактурное действие избыточного содержания кальция на изолированное сердце [18].

Таким образом, в результате адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям наряду с активацией центральных стресс-лимитирующих систем [20, 44], на уровне самого сердца формируется какой-то защитный механизм, обладающий

способностью предупреждать нарушения кальциевого гомеостаза и ограничивать аритмии, в патогенезе которых увеличенный вход  $\text{Ca}^{2+}$  и нарушения работы кальциевого насоса СПР играют существенную роль [42, 50].

В соответствии с этим цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить влияние адаптации к кратковременным неповреждающим стрессорным воздействиям (и, напротив, длительного, заведомо повреждающего иммобилизационного стресса) на эффективность функционирования Са-транспортирующей системы СПР и динамику инактивации кальциевого насоса эндогенными факторами при длительном хранении.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 200—220 г. Проведены 4 серии опытов. Первая серия — контроль, вторая — длительный иммобилизационный стресс, который создавали путем фиксации животных за конечности на спине в течение 6 ч. Третья серия — адаптация животных к неповреждающим стрессорным воздействиям предусматривала 8 иммобилизационных стрессорных воздействий по 1 ч в день, через день, с двумя подготовительными сеансами по 25 и 45 мин. Четвертая серия — длительный иммобилизационный стресс на фоне предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям. В этой серии животных подвергали стрессу на следующий день после завершения курса адаптации. Крыс декапитировали через 2 ч после стресса или через сутки после завершения курса адаптации. В каждой серии использовано по 8 животных. Сердце извлекали, промывали физиологическим раствором и замораживали в жидком азоте до использования.

Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  определяли на ионметре EA-940 с селективным электродом к Са. Суть метода заключается в измерении скорости поглощения добавленного  $\text{Ca}^{2+}$  везикулами СПР в присутствии оксалата  $\text{K}^+$ . При этом накопление  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями предотвращалось добавлением  $\text{NaN}_3$ , а поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  сарколеммальными везикулами практически отсутствовало вследствие добавления оксалата  $\text{K}^+$ , который в эти везикулы не проходит.

Сердце измельчали гомогенизатором «Ultra-Turrax» ножом 25N — 10 в течение 30 с при скорости 8. Среда гомогенизации содержала 100 мМ  $\text{KCl}$ , 20 мМ имидазол (рН 7,8) и 25 % глицерин, соотношение ткань : среда равнялось 1:4. Полученные гомогенаты были использованы для определения скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в термостатируемых ячейках с перемешиванием, для чего аликвоты по 50—200 мкл гомогената добавляли в 5 мл среды, содержащей 100 мМ  $\text{KCl}$ , 15 мМ оксалат  $\text{K}^+$ , 20 мМ  $\text{Hepes}$  (рН 7,0 при 37 °С), 4 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 5 мМ  $\text{NaN}_3$ . Отдельно готовили растворы АТФ и  $\text{CaCl}_2$ , которые добавляли в среду инкубации перед определением до конечных концентраций 4 мМ АТФ и 5—35 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ . Реакцию начинали добавлением гомогената, регистрируя транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в течение 5 мин.

Кинетика снижения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, которая отражает процесс транспорта этого иона внутрь везикул СПР, нелинейна в связи с нелинейными характеристиками самого электрода. Поэтому для расчета скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в точке 1,5 мин от начала реакции проводили касательную и по ней с учетом калибровочных кривых по характеристике электрода определяли скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ . Калибровку по кальцию проводили в среде инкубации с АТФ, добавляя по 25 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  и регистрируя изменения в милливольтгах.

Для изучения влияния длительного хранения на скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР гомогенаты хранили при 4 °С и определяли скорость транспорта на 1, 2, 3 и 4-е сутки после гомо-

генизирования по указанной выше методике. Все расчеты по экспериментальным кривым и статистическую обработку проводили на компьютере «Olivetti». Содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в АТФ не превышало 0,002 %, поскольку более высокое содержание  $\text{Ca}^{2+}$  существенно препятствует измерению транспорта с помощью Са-селективного электрода.

### Результаты

На рис. 1 представлены экспериментальные кривые, отражающие процесс транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР во всех сериях опытов. При качественной оценке кривых обращают на себя внимание два обстоятельства. Во-первых, повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  после добавления гомогената в инкубационную ячейку (сегмент А) оказывается при стрессе значительно большим, чем в контроле, а при адаптации к неповреждающим стрессорным воздействиям, напротив, меньшим. При стрессе, проведенном на фоне предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям, этот подъем близок к контролю.

Во-вторых, последующее снижение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (сегмент В), отражающее скорость его захвата везикулами СПР, при стрессе оказывается значительно более медленным, а при адаптации более быстрым, чем в контроле. При стрессорном воздействии на фоне адаптации его снижение мало отличается от контроля. Таким образом, уже при непосредственной оценке экспериментальных кривых создается впечатление, что концентрация свободного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в гомогенатах после перенесенного стресса повышена, а скорость его поглощения в СПР снижена; при адаптации наблюдается противоположная картина, и, наконец, при стрессе на фоне адаптации концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и скорость его поглощения близки к контролю.

Количественный анализ результатов не только подтверждает это впечатление, но показывает, что действие адаптации было весьма сильным и преобладало над действием стресса. Действительно, исходная концентрация свободного кальция в гомогенате в контроле составляла 7,1 нмоль на 1 мг белка, при стрессе она была повышена на 25 %, при адаптации, напротив, снижена на 37 % и при стрессе на фоне адаптации достоверно не отличалась от наблюдаемой при адаптации. С наибольшей долей вероятности эти соотношения были обусловлены лабилизацией мембранных структур кардиомиоцитов при стрессе и выходом из них  $\text{Ca}^{2+}$  и, напротив, повышением способности СПР и митохондрий удерживать  $\text{Ca}^{2+}$  при адаптации.

Кривые на рис. 2 отражают зависимость скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР от нарастающей концентрации этого иона в окружающей среде для каждой из 4 серий эксперимента. Видно, что в контроле скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается по мере роста его концентрации в среде и при концентрации  $0,5 \cdot 10^{-5}$  М составляет 13,6 нмоль

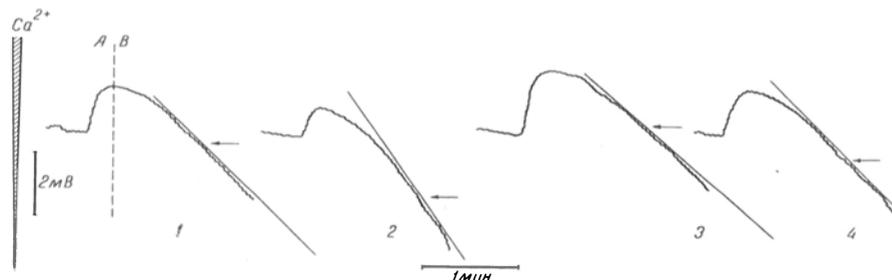


Рис. 1. Экспериментальные кривые поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  везикулами СПР миокарда в контроле (1), при адаптации к коротким стрессорным воздействиям (2), при длительном стрессорном воздействии (3) и стрессе на фоне предварительной адаптации (4).

Стрелкой отмечена точка касательной. Остальные обозначения см. в тексте.

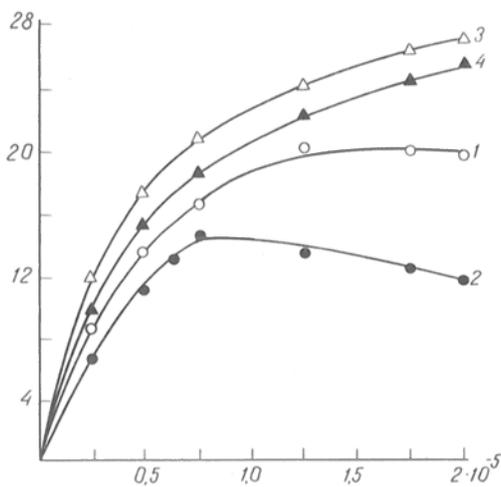


Рис. 2. Зависимость скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР от его концентрации в среде.

1 — контроль, 2 — иммобилизационный стресс, 3 — адаптация к коротким стрессорным воздействиям, 4 — стресс на фоне предварительной адаптации. По оси абсцисс — молярная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  (в М); по оси ординат — скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  (в нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мин на 1 мг белка).

$\text{Ca}^{2+}$ /мин на 1 мг белка, а в области концентрации  $(1-2) \cdot 10^{-5}$  М выходит на плато. Для СПР животных, перенесших длительный стресс, скорость захвата  $\text{Ca}^{2+}$  растет медленнее; при концентрации  $0,5 \cdot 10^{-5}$  М скорость транспорта равна 11,2 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мин на 1 мг белка, т. е. уменьшена на 20 % и достигает максимального значения раньше — уже при концентрации  $0,75 \cdot 10^{-5}$  М. При увеличении концентрации выше физиологической в результате стресса возникает ненаблюдаемое в контроле явление — депрессия скорости. Поэтому при максимальной использованной нами концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  —  $2 \cdot 10^{-5}$  М скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  уже на 41 % ниже по сравнению с контролем. Иными словами, снижение скорости поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  при высоких концентрациях этого иона в СПР животных, перенесших стресс, оказывается в 2 раза больше, чем при физиологических концентрациях.

Адаптация к повторным кратковременным стрессорным воздействиям приводит к тому, что скорость захвата  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на повышение его концентрации нарастает значительно быстрее, чем в контроле, и при концентрации  $0,5 \cdot 10^{-5}$  М составляет 17,8 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мин на 1 мг белка, т. е. она увеличена более чем на 30 %. Существенно также, что при адаптации скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР продолжает нарастать при тех концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ , при которых в контроле она выходит на плато. Соответственно при высоких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  ( $2 \cdot 10^{-5}$  М) скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  СПР адаптированных животных на 38 % выше, чем в контроле. Для СПР животных, которые перенесли стресс после предварительной адаптации, скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  при всех изученных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  во внешней среде оказалась несколько ниже, чем при адаптации. Однако она была выше контрольной и не выходила на плато при максимальной использованной нами концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, по форме и абсолютной величине зависимость между концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  и скоростью его поглощения и в этом случае ближе к серии адаптации, чем к контрольной.

Как при физиологических, так и при высоких

концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  скорость его поглощения в СПР адаптированных животных, перенесших стресс, достоверно выше, чем для СПР «стрессорных» животных. Таким образом, предварительная адаптация не только сама по себе повышает способность СПР сердечной мышцы аккумулировать  $\text{Ca}^{2+}$ , но и защищает мембраны СПР от повреждающего действия длительного иммобилизационного стресса.

Скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  мембраной СПР контролируется мембранно-связанным липидзависимым ферментом — Са-АТФазой и в принципе может изменяться как вследствие увеличения количества фермента, скорости его оборота, так и в результате изменения сродства фермента к  $\text{Ca}^{2+}$ . Чтобы сопоставить вклад этих механизмов в обнаруженные изменения скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  при стрессе и адаптации, мы проанализировали

концентрационные зависимости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР во всех 4 сериях, при этом кривые были обработаны по методу обратных величин по Лайнуиверу — Берку и получены соответствующие значения кинетических параметров этого процесса  $K_M$  и  $V_{\max}$  (см. таблицу).

Видно, что в результате стрессорного воздействия и при адаптации к нему происходит изменение как  $K_M$ , так и  $V_{\max}$ . В случае стрессорного воздействия максимальная скорость уменьшается, а  $K_M$  возрастает, что в целом приводит к снижению скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако степень изменения этих параметров резко различается: если  $K_M$  в результате стресса увеличивается на 30 %, т. е. практически на  $1/3$  уменьшается сродство процесса транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  к этому иону, то  $V_{\max}$  уменьшается менее чем на 10 %.

Противоположная по направленности сдвигов, но вполне аналогичная по соотношению  $V_{\max}$  и  $K_M$  ситуация наблюдается при адаптации.  $V_{\max}$  увеличивается на 10 %, в то время как  $K_M$  уменьшается более чем на 30 %. Существенно, что эти цифры характеризуют не только значительную оптимизацию работы Са-транспортующей системы при адаптации, но также свидетельствуют о следующем. Как в результате стресса, так и после адаптации к нему изменение свойств самого фермента Са-АТФазы СПР вносит большой вклад в общее снижение или соответственно увеличение эффективности транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , что определяется  $K_M$ , по сравнению с простым изменением количества молекул или числа оборотов фермента ( $V_{\max}$ ).

Кинетические параметры транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  везикулами СПР миокарда крысы в контроле, после длительного иммобилизационного стресса, адаптации к коротким стрессорным воздействиям и стресса на фоне предварительной адаптации

Параметр	Контроль	Стресс	Адаптация	Адаптация + стресс
$K_M$ : мкМ %	13,2 100	17,2 130,6	9,19 69,7	10,9 82,5
$V_{\max}$ : ед. акт. %	30,7 100	28,6 93,1	33,7 109,4	32,2 104,8

Известно, что активность Са-АТФазы СПР в высокой степени зависит от состояния его липидного микроокружения и, следовательно, от действия эндогенных клеточных факторов, таких как липазы, фосфолипазы, протеазы, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и т. д. При стрессе и адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям изменение активности этих факторов доказано и, следовательно, они в той или иной мере могут влиять на Са-АТФазу и транспорт Са в СПР. Учитывая это, мы считали целесообразным изучить динамику инактивации Са-насоса СПР в процессе хранения гомогената, поскольку при этом может реализоваться действие эндогенных факторов деградации клеточных структур.

Кривые на рис. 3 отражают динамику снижения активности транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР при температуре 4 °С. Видно, что в контроле скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  практически линейно уменьшается до 3-го дня хранения. Затем снижение активности Са-транспортной системы ускоряется, и к 4-му дню сохраняется лишь 20 % транспорта от первоначального значения. Для СПР животных, перенесших стресс, снижение скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  происходит гораздо быстрее (по экспоненте, а не линейно). Так, если исходно скорость транспорта при стрессе составляет 90 % от исходного значения в контроле, то через 3 дня хранения эта величина равна лишь 17 %, причем к 4-му дню хранения активность транспорта при стрессе не регистрируется. СПР животных, адаптированных к кратковременным стрессорным воздействиям, обладает значительно большей стабильностью при хранении, чем в контроле. В этой серии скорость транспорта при хранении уменьшается также нелинейно, но, наоборот, в гораздо меньшей степени, чем в контроле. Действительно, непосредственно после гомогенизирования активность транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР адаптированных животных составляет 119 % от контроля, а после длительного хранения это значение возрастает до 290 %. Таким образом, адаптация увеличивает стабильность мембраны и связанного с нею фермента — Са-АТФазы — и предупреждает инактивацию кальциевого насоса СПР эндогенными факторами де-

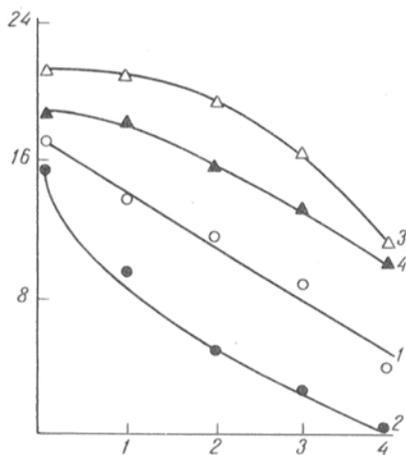


Рис. 3. Влияние длительности хранения гомогенатов при 4 °С на скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР.

По оси абсцисс — длительность хранения (в днях); по оси ординат — скорость транспорта (в нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мин на 1 мг белка). Остальные обозначения, как на рис. 2.

градации при стрессе. Скорость транспорта при стрессе после предварительной адаптации хотя и снижается при хранении несколько быстрее, чем при адаптации, но тем не менее значительно медленнее, чем в контроле, и к 4-му дню хранения составляет 269 % от контрольного уровня. Следовательно, адаптация так существенно повышает стабильность мембраны СПР по отношению к естественным факторам повреждения мембраны, что даже после перенесенного стресса стабильность кальциевого насоса СПР оказывается более чем в 2,5 раза выше, чем в контроле.

Другим критерием состояния мембранных структур миокарда в наших опытах служила динамика накопления свободного Са при длительном хранении гомогената, т. е. процесс, который главным образом определяется выходом Са из его внутриклеточных депо — СПР и митохондрий. Первоначальное содержание Са в контроле равно 7,1 нмоль Са на 1 мг белка; при хранении она линейно нарастает и к 4-му дню составляет 13,2 нмоль на 1 мг белка (рис. 4). После длительного стресса первоначальное содержание Са увеличено на 25 % по сравнению с контролем и при хранении увеличивается в еще большей степени. Если в контроле через 3 дня хранения содержание  $\text{Ca}^{2+}$  повышается на 62 % от первоначального значения, то после длительного стресса уровень кальция увеличился почти в 2 раза. Адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям приводит к тому, что за такой же срок хранения гомогената содержание  $\text{Ca}^{2+}$  повышается в 2,5 раза медленнее, чем в контроле, и за время хранения возрастает лишь на 25 % от первоначального уровня. Длительный стресс после такой адаптации не только не увеличивает скорость накопления Са, но даже снижает ее в такой степени, что значение уровня Са через 4 дня хранения в этой серии достоверно не отличается от исходного его содержания. Этот поразительный факт практически полного отсутствия утечки Са из СПР и митохондрий животных, перенесших стресс на фоне адаптации, свидетельствует о радикальном увеличении стабильности мембранных структур в процессе адаптации и ее способности блокировать действие эндогенных повреждающих факторов, действующих в процессе аутолиза.

## Обсуждение

Данные полученные в эксперименте, делают це-

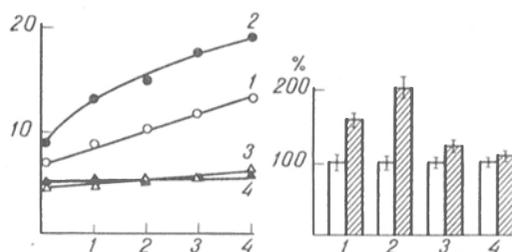


Рис. 4. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в гомогенатах миокарда по мере хранения.

По оси абсцисс — длительность хранения (в днях); по оси ординат — содержание  $\text{Ca}^{2+}$  (в нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /100 мкл гомогената — соотношение ткань: среда равно 1:4). Заштрихованные столбики — степень увеличения содержания  $\text{Ca}^{2+}$  через день хранения по отношению к исходному содержанию (светлые столбики) во всех сериях (см. обозначения в подписи к рис. 2), принятому за 100 %.

лесообразным анализ механизма двух основных явлений: во-первых, возникающего под влиянием стресса нарушения функционирования кальциевого насоса СПР и его ускоренной инактивации при длительном хранении и, во-вторых, значительного повышения эффективности функционирования этого насоса и почти полного отсутствия его инактивации при длительном хранении после адаптации к повторным стрессорным воздействиям.

I. Стрессорные повреждения кальциевого насоса СПР, выявившиеся в свежих гомогенатах (см. рис. 2) и стрессиндуцированное ускорение инактивации этого насоса при хранении гомогенатов (см. рис. 3), по-видимому, связаны между собой. Эта связь выражается в том, что при стрессе и при автолизе, который медленно реализуется при хранении гомогенатов при 4 °С, существенную роль играет активация одних и тех же естественных факторов разрушения клеточных структур. Действительно, при стрессе показаны активация фосфолипаз [40], ПОЛ [15], лабильзация лизосом и освобождение протеаз [19] и соответственно повреждение мембран, сопровождающееся снижением активности таких липидзависимых мембранно-связанных ферментов, как Na, K-АТФаза [21] и Са-АТФаза СПР [11]. При автолизе в свою очередь также показана активация ПОЛ [1, 5, 8], фосфолипаз [4, 7, 32], протеаз [27], лабильзация лизосом [49] и снижение активности липидзависимых мембранно-связанных ферментов [45, 46]. Понятно поэтому, что стрессорное повреждение не только приводит к депрессии функции кальциевого насоса СПР и становится причиной таких прижизненных феноменов, как увеличение содержания Са в саркоплазме [22], снижение порога фибрилляции сердца [12] и постстрессорной ригидности сердечной мышцы [3], но также ускоряет посмертную инактивацию кальциевого Са-насоса СПР в процессе автолиза. Существенно, что в наших опытах стрессорное повреждение приводило к увеличению содержания свободного Са в гомогенате и потенцировало накопление его в процессе автолиза (см. рис. 4). Эта утечка Са из структур — с наибольшей вероятностью из СПР и митохондрий — согласуется с фактом прижизненного накопления Са в кардиомиоцитах, поврежденных стрессом [22] или ишемией [24, 37, 43]. Поскольку Са обладает способностью активировать фосфолипазы [26, 33], протеазы [36], а в определенном диапазоне концентраций и ПОЛ [2, 6], данный сдвиг может приводить к тому, что в группах кардиомиоцитов замыкается своеобразный «порочный круг», в котором факторы естественной деградации или разборки структур увеличивают выход Са из внутриклеточных депо этого иона, а он в свою очередь потенцирует их цитотоксическое действие. При однократном тяжелом стрессе этому соответствует возникновение микронекрозов, а в дальнейшем очагового кардиосклероза [9].

II. Способность адаптации к кратковременным неповреждающим стрессорным воздействиям предупреждать нарушение структуры, функции и электрической стабильности сердца при стрессорных, ишемических и реперфузионных повреждениях была установлена в 1985 г. и затем подтверждена в дальнейших работах [10, 14]. В настоящем

сообщении впервые выяснено, что важным компонентом адаптационной защиты сердца на уровне кардиомиоцитов является увеличение эффективности функционирования кальциевого насоса СПР (см. рис. 2) и в еще большей мере увеличение устойчивости мембран СПР к действию перечисленных выше естественных факторов деградации клеточных структур (см. рис. 3, 4). Увеличение эффективности кальциевого насоса СПР и уменьшение утечки Са из СПР и митохондрий само по себе является цитопротекторным фактором, ограничивающим повреждающий эффект кальций-зависимых ферментов деградации структур и блокирующим формирование описанного выше «порочного круга» разрушения кардиомиоцитов.

Вместе с тем главный вопрос о том, за счет каких молекулярных механизмов адаптация к стрессорным воздействиям приводит к активации кальциевого насоса СПР и увеличению стабильности его структуры к действию естественных факторов деградации, повреждающих клетки при автолизе и стрессе, весьма сложен и в настоящее время может обсуждаться лишь в предположительном плане.

Достоверно известно, что при адаптации к стрессорным воздействиям в сердце животных происходит умеренное увеличение активности антиоксидантных ферментов — каталазы и супероксиддисмутазы [28], а в условиях *in vitro* препараты миокарда таких животных обнаруживают значительно повышенную устойчивость к аритмогенному эффекту индукции ПОЛ [16]. Показано также, что аналогичным образом активация антиоксидантных систем и цитопротекторный эффект адаптации реализуются на уровне печени [23], а на уровне желудка адаптационное увеличение устойчивости слизистой к повреждающему действию химических факторов обеспечивается активацией синтеза простагландинов [47]. Таким образом, первое достаточно обоснованное предположение состоит в том, что при адаптации к стрессорным воздействиям происходит активация таких локальных стресслимитирующих систем, как антиоксидантная, простагландиновая и аденозинергическая, которые по последним данным могут ингибировать действие катехоламинов [41, 48], вход Са [29, 30], активацию ПОЛ [28] и т. д.

Другое более простое предположение состоит в том, что наблюдаемая при каждом, даже малом стрессе активация ПОЛ, субстратом которого являются прежде всего ненасыщенные жирные кис-

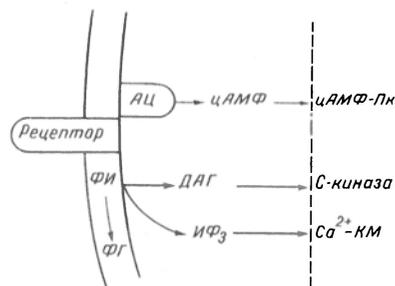


Рис. 5. Схема передачи сигналов от первичных эффекторов к вторичным мессенджерам.

АЦ — аденилатциклазная система, цАМФ-КМ — цАМФ-зависимая протеинкиназа С, ФИ — фосфатидилинозит, ДАГ — диацилглицерин, ИФ<sub>3</sub> — инозит-1,4,5-трифосфат, ФГ — фосфатидилглицерин, Ca<sup>2+</sup>-КМ — (Ca<sup>2+</sup> + кальмодулин)-зависимые протеинкиназы (F. Gorelick, 1987 г.).

лоты, а также активация фосфолипаз и липаз может постепенно модифицировать жирнокислотный или фосфолипидный состав мембран и изменить микроструктуру липидного окружения мембранно-связанных ферментов. В результате активность этих ферментов, в частности Са-АТФазы СПР, ее устойчивость к естественным факторам деградации оказывается увеличенной. В пользу такого предположения могут свидетельствовать результаты, описанные в работе [37].

Наконец, наиболее интересное, с нашей точки зрения, объяснение полученных факторов связано с быстро развивающимся в последние годы представлением о сигнальной системе инозитолтрифосфат — диацилглицерол (рис. 5). При этом следует иметь в виду, что многократные кратковременные стрессорные воздействия подразумевают многократную активацию сложного каскада внутриклеточной регуляции, представленного в работе [35]: активация адренорецепторов избытком катехоламинов при стрессе включает два каскада регуляции. Во-первых, активация аденилциклазы, увеличенное образование цАМФ, которая через систему протеинкиназ потенцирует такие основные эффекты кальмодулина, как гликолиз, захват Са в СПР, сокращение. Во-вторых, при действии адренергического сигнала в результате активации фосфолипазы С из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (ИФ-2) образуется инозитолтрифосфат (ИФ-3) и диацилглицерин, причем ИФ-3 является во всех тканях, и как теперь показано в сердце [31], мессенджером, который выходит из сарколеммы, достигает СПР и вызывает освобождение оттуда порции Са, необходимой для сокращения. Диацилглицерол, как установлено, является мессенджером иного рода — в клетках позвоночных он опосредованно через протеинкиназу С действует на Na-H-обменник, вызывая таким образом некоторое повышение рН клеток [34]. В настоящее время выдвинуто предположение, что таким образом диацилглицерол может активировать транскрипцию, репликацию и играть роль в росте клеточных структур и пролиферации [34, 35]. Смена представлений в этой быстро развивающейся области трудно предсказуема, однако в плане нашего изложения существенно, что диацилглицерол образует контур регуляции, который при многократной активации может постепенно способствовать определенному структурному обеспечению многократно повторяющихся физиологических реакций. В этом случае многократная кальциевая нагрузка и активация кальциевого насоса СПР, а также физиологических эндогенных факторов деградации мембран при повторных стрессорных воздействиях неизбежно должна быть связана с многократными эффектами диацилглицерола. Если это предположение справедливо, то в процессе адаптации возможен прямой рост структур СПР, подобный тому, который доказан количественными электронно-микроскопическими исследованиями при адаптации к физическим нагрузкам [39], а также изменение свойств Са-АТФазы СПР, обеспечивающие повышение ее активности и стабильности. В целом молекулярные механизмы защитного эффекта постепенной адаптации к ограниченному стрессорным воздействиям во многих отношениях неясны и заслуживают дальнейших исследований.

1. Бондаренко Н. А., Девяткина Т. А., Воскресенский О. П., Вальдман А. В. // Бюл. экспер. биол.— 1985.— № 7.— С. 12—14.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. Воронцова Е. Я., Пшеничкова М. Г., Меерсон Ф. З. // Кардиология.— 1982.— № 11.— С. 68—72.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 4.— С. 33—36.
5. Джафаров А. И. // Бюл. экспер. биол.— 1981.— № 10.— С. 425—427.
6. Казан В. Е., Савов В. М., Диденко В. В. и др. // Там же.— 1983.— № 4.— С. 46—48.
7. Козельцев В. А., Голубев В. П., Володина Т. В. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 5.— С. 680—685.
8. Лемешко В. В., Никитченко Ю. В., Калиман Г. А. // Укр. биохим. журн.— 1982.— Т. 54, № 3.— С. 325—327.
9. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
10. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам.— М., 1988.
11. Меерсон Ф. З., Архипенко Ю. В., Рोजицкая И. И. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1981.— № 4.— С. 405—406.
12. Меерсон Ф. З., Белкина Л. М., Дюсенов С. С. и др. // Кардиология.— 1985.— № 10.— С. 29—34.
13. Меерсон Ф. З., Белкина Л. М., Дюсенов С. С. // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 11.— С. 536—538.
14. Меерсон Ф. З., Белкина Л. М., Дюсенов С. С. и др. // Кардиология.— 1986.— № 8.— С. 19—24.
15. Меерсон Ф. З., Казан В. Е., Прилишко Л. Л. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1979.— № 10.— С. 404—406.
16. Меерсон Ф. З., Каткова Л. С. // Там же.— 1985.— № 12.— С. 659—661.
17. Меерсон Ф. З., Малышев И. Ю., Белкина Л. М., Салтыкова В. А. // Кардиология.— 1988.— № 1.— С. 70—74.
18. Меерсон Ф. З., Малышев И. Ю. // Обмен кальция в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы.— Томск, 1988.— Ч. 2.— С. 144—146.
19. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Камиллов Ф. Х., Якушев В. С. // Пат. физиол.— 1979.— № 3.— С. 26—31.
20. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г., Шабунина Е. В. и др. // Вестн. АМН СССР.— 1987.— № 6.— С. 47—54.
21. Меерсон Ф. З., Сазонтова Т. Г., Казан В. Е. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1983.— № 12.— С. 42—44.
22. Меерсон Ф. З., Самосудова И. В., Глаголева Е. В. и др. // Арх. анат.— 1983.— № 2.— С. 43—49.
23. Меерсон Ф. З., Твердохлеб В. П., Лобанова В. Т., Никаноров А. А. // Физиол. журн.— 1987.— Т. 33, № 6.— С. 3—7.
24. Меерсон Ф. З., Уголев А. А. // Кардиология.— 1980.— № 1.— С. 68—75.
25. Меерсон Ф. З., Шимкович М. В., Хорунжий В. А. // Бюл. экспер. биол.— 1980.— № 3.— С. 272—274.
26. Рахимов М. М., Алматов К. Т. // Биохимия.— 1978.— Т. 43.— С. 1390—1403.
27. Ребров Л. Б., Козельцев В. П., Шишкин С. С., Дебов С. С. // Вестн. АМН СССР.— 1983.— № 10.— С. 82—89.
28. Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В., Меерсон Ф. З. // Бюл. экспер. биол.— 1987.— № 10.— С. 411—413.
29. Belardinelli L., Rubio R., Berne R. M. // Pflügers Arch.— 1979.— Bd 380.— S. 19—27.
30. Berne R. M. // Circulat. Res.— 1980.— Vol. 47, N 6.— P. 807—813.
31. Berridge M. J. // J. cardiovasc. Pharmacol.— 1986.— Vol. 18, Suppl. 8.— P. S85—S90.
32. Boime I., Smith E. E., Hunter F. E. // Arch. Biochem.— 1970.— Vol. 139, N 2.— P. 425—443.
33. Chien K. R., Pfanz R. G., Farber J. L. // Amer. J. Path.— 1979.— Vol. 97, N 4.— P. 505—530.
34. Combettes L., Berthon B., Claret M. // Biochimie.— 1987.— Vol. 69.— P. 281—286.
35. Gorelick F. S. // Gut.— 1987.— Vol. 28, Suppl. 1.— P. 79—84.
36. Dayton W. R., Schollmeyer J. V. // J. molec. cell. Cardiol.— 1980.— Vol. 12, N 6.— P. 533—552.
37. Dhalla N. S., Panagia V., Singal P. K. et al. // Ibid.— 1988.— Vol. 20, Suppl. 2.— P. 3—13.
38. Gudbjarnasson S., Deell B., Oskursdottir G., Hillgrímsson J. // Tocopherol, Oxygen and Biomembranes.— Amsterdam, 1978.— P. 297—310.
39. Guski H., Meerson F., Massilew G. // Exp. Path.— 1981.— Vol. 20.— P. 108—120.

40. Katz A., Messineo F. // *Circulat. Res.*— 1981.— Vol. 48.— P. 1—16.
41. Khan M. T., Malik K. U. // *Europ. J. Pharmacol.*— 1982.— Vol. 78.— P. 213—218.
42. Klusin W., Lake K., Smith N., Buchpinder M. // *Membrane and Muscle.*— Oxford, 1985.— P. 291—307.
43. Naylor W. G., Roole-Wilson P. A., Williams A. // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1979.— Vol. 11.— P. 683—706.
44. Skinner J. // *Stress and Neart Disease.*— Boston, 1985.— P. 44—59.
45. Suyatna F. D., v. Veldhoven P. P., Borgers M. et al. // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1988.— Vol. 20, N 1.— P. 47—62.
46. van Jaarsveld H., Potgieter G. M., Lochner A. // *Enzyme.*— 1988.— Vol. 39, N 3.— P. 151—161.
47. Wallace J., Cohen M. // *Amer. J. Physiol.*— 1984.— Vol. 247.— P. 6127—6132.
48. Westfall Th. C. // *Physiol. Rev.*— 1977.— Vol. 57, N 4.— P. 659—728.
49. Wildenthal K. // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1978.— Vol. 10, N 7.— P. 595—603.
50. Wit A., Rosen M. // *Amer. Heart J.*— 1983.— Vol. 106, N 4.— Pt. 2.— P. 798—811.

Поступила 12.01.89

ADAPTATION TO SHORT-TERM STRESSORY ACTIONS INCREASED THE  $Ca^{2+}$ -PUMP ACTIVITY IN SARCOPLASMIC RETICULUM AND DECREASED THE RATE OF ITS INACTIVATION IN AUTOLYSIS

F. Z. Meerson, T. G. Sazonova, Yu. V. Arkhipenko

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Effects of long-term immobilization stress and adaptation to short-term stressory actions on  $Ca^{2+}$ -transport system were studied in sarcoplasmic reticulum (SR) of rat myocardium. The stress inhibited the rate of  $Ca^{2+}$  transport in SR, while adaptation not only optimized the  $Ca^{2+}$ -pump functions but prevented the stress-induced impairments of its functions. After stress resistance of  $Ca^{2+}$ -pump to endogenous impairing factors (in autolysis) was decreased 2-3-fold, whereas adaptation increased the SR membrane stability so distinctly that after simultaneous stress the membrane stability was maintained at the level which was 2.5-times higher as compared with controls. Long-term stress caused also the higher output of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores as compared with controls, while during adaptation and simultaneous stress and adaptation the loss of  $Ca^{2+}$  was practically absent. Protective effects of adaptation to short-term stressory actions on the  $Ca^{2+}$ -transport system of cardiomyocytes are discussed.

© Ж. И. МАМУТОВ, 1990

УДК 616.438-089.87-092.9-089.168:615.361.438.015.2:615.874.2]-036.8-07:616.36+616.411+616.419]-008.939.15-39

Ж. И. Мамутов

**ВЛИЯНИЕ ТИМОЗИНА И АЛИМЕНТАРНЫХ ПИЩЕВЫХ ФАКТОРОВ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ, СЕЛЕНКЕ, КОСТНОМ МОЗГЕ И ЛИМФОЦИТАХ ТИМЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС**

Среднеазиатский медицинский педиатрический институт, Ташкент

Тимэктомия наряду с иммунологическими сдвигами вызывает существенные изменения в эндокринном и метаболическом гомеостазе [10, 11, 16, 23], сходные с наблюдаемыми при вторичных иммунодефицитах человека. Показано, что при многих патологиях в первую очередь страдают биологические мембраны [15]. Многообразные функции клеточных мембран связаны с их

белковыми и липидными компонентами. Липиды мембран, включая минорные компоненты, образуют с белками и углеводами единую систему, выполняют роль структурного компонента мембранных систем клетки, участвуют в регуляции активности мембранных ферментов, транспорте разнообразных веществ, процессах перекисления фосфолипидов, определяют также чувствительность клеток к гормонам, выполняют функции связующего звена между мембранными рецепторами и системой аденилатциклазы, участвуют в функционировании лимфоцитов [1, 3—5, 17, 19—21, 31—34]. В регуляции структуры и функции биомембран большое значение придается минорным эссенциальным компонентам пищи, особенно жирорастворимым витаминам [2, 18, 20]. Однако до настоящего времени отсутствуют сведения об изменении спектра фосфолипидов и интенсивности их перекисления в органах и клетках иммунной системы, субклеточных органеллах печени в условиях иммунодефицита, вызванного тимэктомией, а также о возможности их коррекции гормонами тимуса в сочетании с алиментарными пищевыми факторами.

Методика

Опыты проведены на 208 половозрелых белых крысах-самцах линии Вистар с начальной массой 120—150 г. Животных разделили на 4 группы по 7—10 в каждой. 1-я группа — ложнопериоперированные крысы (контроль), 2-я — тимэктомированные, 3-я — тимэктомированные, получавшие тимозин, 4-я — тимэктомированные, получавшие тимозин в сочетании с витаминами А и Е и специальным рационом.

Модель иммунного дефицита воспроизводили тимэктомией под легким эфирным наркозом. Полноту тимэктомии оценивали макроскопически в момент забоя животного, а также косвенно исследованием лейкоцитарной формулы в динамике после операции. Ложная операция включала те же этапы, что и при удалении вилочковой железы, но последнюю не извлекали. Через 1, 2, 3, 6 и 12 мес после операции тимэктомированным животным в течение 10 дней внутримышечно вводили тимозин пятой фракции (0,5 мкг на 1 г массы), полученный по методике Goldstein и соавт. [29] из тимуса телят.

Подопытным животным витамины А (ретинола ацетат) и Е (5% масляный раствор токоферола ацетата) вводили орально в суточной дозе соответственно 3000 МЕ и 0,5 мг/кг в течение 10 дней, а контрольным по той же схеме — растворитель витаминов — масло. Пищевые вещества, входящие в состав дополнительного рациона, содержали в 1,4—2,0 раза больше белков и жиров различных витаминов и микроэлементов. Митохондрии печени выделяли центрифугированием надосадочной фракции [30] в 0,25 М сахарозе с 2-кратной промывкой. Микросомальную фракцию печени получали методом дифференциального центрифугирования на центрифуге VAG-601 при 150 000 g 60 мин. Лимфоциты из периферической крови выделяли в градиенте фиколл — верографии [22].

Липиды из гомогената органов и субклеточных фракций, костного мозга и лимфоцитов периферической крови экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1). Экстракты промывали методом Фолча [27]. Состав фосфолипидов анализировали методом ТСХ на силикагеле марки «ЛС Хемапол» (ЧССР). Силикагель и пластинки готовили по способу Г. В. Новицкой [14]. Для одномерной хроматографии использовали систему хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (65:43:1:4). Для двумерной хроматографии применяли следующие системы растворителей: направление I — хлороформ — метанол — вода (65:25:4), направление II — хлороформ — метанол — 25% аммиак (14:16:1) [9]. Фракции фосфолипидов экстрагировали в I п. метанольном растворе HCl, экстракт упаривали досуха [9] и определяли количество неорганического фосфора [26]. Содержание малонового диальдегида (МДА) — одного из продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — исследовали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [7]. При индуцированном ПОЛ в среду добавляли 0,5 мМ аскорбата, 40 мМ трис-HCl