

МЕТАБОЛИЗМ

612.172  
М 540

МИОКАРДА

612,172  
M 540

# МЕТАБОЛИЗМ МИОКАРДА

Материалы  
IV Советско-американского  
симпозиума  
14—16 сентября 1979 г.,  
Ташкент, СССР

Под редакцией  
акад. Е. И. ЧАЗОВА (СССР)  
и проф. Х. Е. МОРГАНА (США)



54.101

УДК 612.172.015.3+616.127-008.9]:061.3(47+73) «1979»](082)

**Метаболизм миокарда.** Материалы IV Советско-американского симпозиума 14—16 сентября 1979 г. Ташкент (СССР) Под ред. Е. П. ЧАЗОВА (СССР), Х. Е. МОРГАНА (США) (совместное издание СССР — США). М.: «Медицина», 1981, с. 376 ил.

В сборнике представлены результаты совместных исследований советских и американских ученых в наиболее актуальных областях экспериментальной кардиологии. Большое внимание уделено роли ионов кальция в регуляции сокращения миокарда и скелетных мышц, механизму энергетического метаболизма в миокардиальных структурах. Заметное место занимают работы, посвященные регуляции метаболизма клеток сердца и сосудов гормонами, простагландинами, продуктами перекисного окисления липидов, циклическими нуклеотидами. Сборник включает результаты исследований азотистого и белкового обмена в миокарде. Серия работ посвящена изучению морфологических изменений в миокарде при частичной и полной ишемии. Несомненный интерес представляют результаты опытов, направленных на создание новых путей транспорта лекарств при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Книга предназначена для биохимиков и кардиологов.

В книге — 179 рис., табл. — 49, библиография — 715 названий.

Перевод американских статей. А. В. Лебедева

М  $\frac{50\ 900-168}{039\ (01)-81}$  204-81. 411200000

## ПРЕДСЕДАТЕЛИ СИМПОЗИУМА

- Е. И. ЧАЗОВ — координатор сотрудничества СССР — США по проблеме «Сердечно-сосудистые заболевания», академик, профессор, Генеральный директор Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- В. И. СМЕРНОВ — председатель симпозиума со стороны СССР, доктор биологических наук, профессор, заместитель Генерального директора Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Х. Е. МОРГАН (H. E. MORGAN) — председатель симпозиума со стороны США, профессор, отдел физиологии Медицинского колледжа Университета штата Пенсильвания, Херши, Пенсильвания, США

## УЧАСТНИКИ СИМПОЗИУМА

- К. АЗИЗОВ — младший научный сотрудник лаборатории ИБС Института кардиологии, Ташкент, СССР
- С. АРИПОВ — министр здравоохранения Узбекской ССР, Ташкент, СССР
- В. БЕРДИЧЕВСКИЙ — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Д. БЛИНКС (J. R. BLINKS) — руководитель отдела фармакологии, Фонд Мейо и Высшая школа медицины им. Мейо, Рочестер, Миннесота, США
- А. БУКАТИНА — старший научный сотрудник Института биофизики АН СССР, Пушчино-на-Оке, СССР
- В. ВАЙСБРОТ — старший научный сотрудник лаборатории электронной микроскопии Института усовершенствования врачей, Ташкент, СССР
- М. ВООН (M. VAUGHAN) — Национальный институт сердца, легких и крови, Национальный институт здоровья, Бетезда, Мэриленд, США
- Н. ГЕЛИНГ — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР

- А. ГИЛМЭН  
(A. G. GILMAN) — профессор отдела фармакологии, Медицинской школы Университета Вирджинии, Шарлоттсвилл, Вирджиния, США
- Д. ГУКОВСКИЙ — руководитель отдела математических методов Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- С. ДАНИЛОВ — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Р. ДЖЕННИНГС  
(R. B. JENNINGS) — профессор, руководитель отдела патологии Медицинского центра Университета Дюка, Дурхэм, Северная Каролина, США
- Р. ЖДАНОВ — старший научный сотрудник лаборатории физико-химических методов Института по биологическому испытанию химических соединений, Москва, СССР
- Ш. ИРГАШЕВ — доцент кафедры гистологии Медицинского института, Ташкент, СССР
- В. КАПЕЛЬКО — руководитель лаборатории физиологии миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- А. КАСЫМХОДЖАЕВ — младший научный сотрудник Института кардиологии, Ташкент, СССР
- Р. КАЦЕНОВИЧ — профессор, директор Института кардиологии Министерства здравоохранения Узбекской ССР, Ташкент, СССР
- С. КОСТКО — старший научный сотрудник Института кардиологии, Ташкент, СССР
- А. КУБАТШЕВ — старший научный сотрудник Института морфологии АМН СССР, Москва, СССР
- В. КУРЕС — заведующий кафедрой фармакологии I Медицинского института, Москва, СССР
- В. КУПРИЯНОВ — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Р. КУРАШВИЛИ — руководитель лаборатории эндокринологии Института кардиологии, Тбилиси, СССР
- Г. ЛАНГЕР  
(J. A. LANGER) — профессор медицины и физиологии, Медицинский центр, Исследовательская лаборатория сердечно-сосудистых заболеваний, Лос-Анджелес, Калифорния, США
- А. ЛЕБЕДЕВ — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Д. ЛЕВИЦКИЙ — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- В. ЛЕДНЕВ — заместитель директора Института биофизики АН СССР, Пуццино-на-Оке, СССР

- Ф. МЕЕРСОН — профессор, заведующий лабораторией патологической физиологии Института нормальной и патологической физиологии АМН СССР, Москва, СССР
- Н. МИРСАЛИХОВА — старший научный сотрудник лаборатории биофизики Института биохимии, Ташкент, СССР
- Ф. НИДЛМЭН  
(PH. NEEDLEMEN) — профессор, руководитель отдела фармакологии Медицинской школы Университета им. Вашингтона, Сент-Луис, Миссури, США
- Д. ОРЛОФФ  
(J. ORLOFF) — директор, Отдел интрамуральных исследований, Национальный институт сердца, легких и крови, Национальные институты здоровья, Мэриленд, США
- Н. ПАЛИАНИЦ — младший научный сотрудник Института химии природных соединений, Ташкент, СССР
- Н. ПАНТЕЛЕЕВА — профессор, руководитель лаборатории химии белка Ленинградского государственного университета, Ленинград, СССР
- О. ПИСАРЕНКО — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- В. ПОМОЙНЕЦКИЙ — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Л. РОЗЕНШТРАУХ — заведующий лабораторией электрофизиологии сердца Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Э. РУУГЕ — старший научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета, Москва, СССР
- С. САЙДКАРИМОВ — научный сотрудник Института усовершенствования врачей, Ташкент, СССР
- В. САКС — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- Д. САПРЫГИН — руководитель лаборатории клинической химии Института сердечно-сосудистой хирургии АМН СССР, Москва, СССР
- Е. СЕВЕРИН — профессор, заместитель директора Института молекулярной биологии АН СССР, Москва, СССР
- Ю. СЕЛЕЗНЕВ — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- В. СТЕФАНОВ — старший научный сотрудник, кафедра биохимии Ленинградского государственного университета, Ленинград, СССР
- В. ТКАЧУК — старший научный сотрудник Московского государственного университета, Москва, СССР
- В. ТОРЧИЛИН — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР

- И. ФЕДОРОВА — старший научный сотрудник лаборатории химии белка Ленинградского государственного университета, Ленинград, СССР
- В. ФЛАЙШЕР (B. FLEISCHER) — профессор молекулярной биологии, Университет им. Вандербильта, Нэшвилл, Теннесси, США
- С. ФЛАЙШЕР (S. FLEISCHER) — профессор молекулярной биологии, Университет им. Вандербильта, Нэшвилл, Теннесси, США
- Х. ХАШИМОВ — старший научный сотрудник Института кардиологии, Ташкент, СССР
- Р. ХЕГЕЛИ (R. J. HEGYELI) — заместитель директора по международным программам, Национальный институт сердца, легких и крови, Национальные институты здоровья, Бетезда, Мэриленд, США
- М. ХУДАЙБЕРДЫЕВ — аспирант кафедры госпитальной терапии Медицинского института, Ташкент, СССР
- Г. ЧЕРНОУСОВА — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР, Москва, СССР
- К. ЮЛДАШЕВ — заместитель министра здравоохранения Узбекской ССР, профессор, заведующий кафедрой кардиологии и функциональной диагностики Института усовершенствования врачей, Ташкент, СССР
- З. ЮНУСОВ — младший научный сотрудник Института кардиологии, Ташкент, СССР
- Л. ЯКУШЕВ — научный сотрудник, Институт усовершенствования врачей, Ташкент, СССР

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие . . . . .	9
Часть первая. Регуляция сокращения и энергетического метаболизма миокарда . . . . .	11
Кальций на поверхности клетки: его роль в регуляции сокращения миокарда. <i>Г. А. Лангер (G. A. Langer), К. Д. Филипсон (K. D. Philipson), Д. М. Берс (D. M. Bers) (США)</i> . . . . .	11
Измерение концентрации $Ca^{2+}$ в сокращающихся мышцах. <i>Д. Р. Блинкс (J. R. Blinks), В. Г. Вир (W. G. Wier), К. В. Сноудон (K. W. Snowdowne) (США)</i> . . . . .	23
Количественная оценка кальцийтранспортирующей способности саркоплазматического ретикулума сердца. <i>Д. О. Левицкий, Д. С. Беневоленский, Т. С. Левченко (СССР)</i> . . . . .	35
Разделение и реконструкция как подход к изучению трех типов кальциевых насосов тканей млекопитающих. <i>С. Флайшер (S. Fleischer), П. Дефо (P. H. DeFoor), Б. Чемберлен (B. R. Chamberlain) (США), Д. О. Левицкий (СССР), К. Гитцен (K. Gietzen), Н. У. Вольф (H. U. Wolf) (США)</i> . . . . .	47
Механизмы регуляции синтеза креатинфосфата в клетках миокарда: сопряжение с реакциями гликолиза и митохондриальным окислительным фосфорилированием, значение компартаментализации креатинкиназы. <i>В. А. Сакс, В. В. Куряилов, Г. В. Елизарова, Э. К. Сеннер (СССР), В. Е. Джекобус (W. E. Jacobus) (США)</i> . . . . .	67
Регуляция креатинфосфатом механической и электрической активности гиподинамического миокарда. <i>Л. В. Розенштраух, А. В. Сакс, В. М. Шаров, И. А. Юрвичус, Е. И. Чазов (СССР)</i> . . . . .	88
О возможности участия креатинкиназы в регуляции клеточного метаболизма. <i>С. Н. Лылова, В. Е. Стефанов, Н. Тааме (СССР)</i> . . . . .	107
Функциональная роль структурной неэквивалентности субъединиц F-актина тонких нитей. <i>В. В. Ледисв (СССР)</i> . . . . .	117
Влияние фаллоидина на нестационарную кинетику мышечного сокращения. <i>А. Е. Букагина, В. И. Морозов (СССР)</i> . . . . .	128
Сходство элементарных стадий гидролиза АТФ в АТФ-азных системах различной природы. <i>И. С. Паптелова, Э. А. Карандашов, И. Е. Красовская, И. В. Кулева, Е. Г. Скворцович, Л. А. Сырцова (СССР)</i> . . . . .	135
Часть вторая. Гормоны, простагландины и циклические нуклеотиды в сердце . . . . .	143
Выделение, характеристика и частичная очистка компонентов катехоламинчувствительной аденилатциклазы. <i>А. Г. Гилман (A. G. Gilman), П. К. Штернвейс (P. C. Sternweis), А. К. Хаулер (A. C. Howlett), Д. К. Нортан (J. K. Northup), М. Смигел (M. Smigel) (США)</i> . . . . .	143
Исследование структуры активных центров аденилатциклазы, протеникиназы и фосфодиэстеразы. <i>Е. С. Северин, Т. В. Булгарина, И. И. Гуляев, М. И. Кочеткова, В. Л. Тушицкая (СССР)</i> . . . . .	156
АДФ-рибозилирование и активация аденилатциклазы. <i>М. Воон (M. Vaughan), Д. Мосс (J. Moss) (США)</i> . . . . .	166
Взаимодействие между $\beta$ -адренергическими рецепторами и аденилатциклазой сердца. <i>В. А. Ткачук, С. Е. Северин (СССР)</i> . . . . .	176



Синтез простагландинов и регуляция тонуса сосудов и функции тромбоцитов. <i>Ф. Нидлман (Ph. Needleman)</i> (США)	187
Простагландины и циклические нуклеотиды как возможные регуляторы адаптивных реакций сердца к острой и хронической перегрузке давлением. <i>В. Д. Помойнецкий, Н. Г. Гелинг, А. А. Пекрасова, Ц. Р. Орлова, Н. М. Черпаченко, С. А. Кудряшов, Д. С. Беневоленский</i> (СССР)	198
Глюкокортикоиды в гормональной регуляции метаболизма сердца. <i>Ю. М. Селезнев, С. М. Данилов, Н. Г. Волкова, Г. В. Колпакова, А. В. Мартынов</i> (СССР)	211
Изучение взаимодействия кардиостероида с $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азой методом ЭПР. <i>Р. И. Жданов, Н. М. Мирсализова, Ю. Ш. Мошковский</i> (СССР)	225
О некоторых особенностях механизма ингибирования $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы сердечной мышцы кардиотоническими гликозидами. <i>Н. М. Мирсализова, Н. Ш. Пальяну, Н. К. Абубакиров</i> (СССР)	231
Активация перекисного окисления липидов как решающее звено в патогенезе стрессорных повреждений сердца и предупреждение стрессорных и гипоксических повреждений антиоксидантом нонолом. <i>Ф. З. Меерсон, Л. Ю. Голубева, В. Е. Каган, М. В. Шимкович, А. А. Уголев</i> (СССР)	237
О соотношении процессов генерации и детоксикации липидных перекисей в нормальном и гипертрофированном сердцах. <i>А. А. Кубатиев, С. В. Андреев</i> (СССР)	251
<b>Часть третья. Биосинтез белка, патология сердца</b>	263
Аминокислоты с разветвленной боковой цепью и регуляция белкового обмена в сердце крысы. <i>В. Чуа (V. Chua), Д. Л. Сиел (D. L. Siehl), Е. О. Фуллер (E. O. Fuller), Х. Е. Морган (H. E. Morgan)</i> (США)	263
Изменения антигенных свойств хроматина миокарда крысы при адаптации к гипоксии. <i>И. А. Федорова, Н. В. Мазуров, Л. Б. Пестерчук</i> (СССР)	279
Изучение азотистого обмена в сердечной мышце с помощью изотопа $^{15}\text{N}$ . <i>О. И. Писаренко, А. В. Артемов, В. И. Смирнов</i> (СССР)	282
Макроэргические фосфаты и контроль объема клетки при детальном ишемическом повреждении. <i>Р. Дженнингс (R. B. Jennings), Х. К. Хокинс (H. K. Hawkins), Дж. Э. Лоув (J. E. Lowe), М. Л. Хилл (M. L. Hill), К. А. Раймер (K. A. Reimer)</i> (США)	301
Сравнительное изучение дефектов проницаемости мембран кардиомиоцитов при глубокой ишемии миокарда и при воздействии изопротеренола с помощью коллоидного лантана. <i>В. Г. Шаров</i> (СССР), <i>Р. Б. Дженнингс (R. B. Jennings), Х. К. Хокинс (H. K. Hawkins)</i> , (США), <i>Ю. М. Селезнев, А. В. Мартынов</i> (СССР)	321
Биохимическая оценка повреждений миокарда человека при полной ишемии во время оперативных вмешательств на сердце. <i>В. И. Бураковский, Д. Б. Сапрыгин, Л. С. Кашгэалян</i> (СССР)	336
Возможность использования липосом для направленного транспорта лекарств при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. <i>В. П. Торчилин, В. Р. Бердичевский</i> (СССР), <i>Бан Ан Ко (Ban An Khow)</i> (США), <i>В. М. Земсков</i> (СССР), <i>Э. Хабер (E. Haber)</i> (США), <i>В. И. Смирнов, Е. И. Чазов</i> (СССР)	346
Сравнительные аспекты влияния $\beta$ -блокаторов и $\beta$ -стимуляторов на функцию миокарда. <i>Б. И. Ткаченко, Р. А. Каценович, С. З. Костюко, Х. А. Хашимов, А. Ш. Касымходжаев, Э. З. Юнусов</i> (СССР)	355
Морфофункциональная характеристика действия цитохрома С на различные зоны миокарда при экспериментальном инфаркте. <i>К. А. Zufarov, Р. А. Каценович, Ш. Б. Иргашев, М. Ф. Худайбердыева, К. И. Азизов</i> (СССР)	364

## ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Советско-американские симпозиумы по актуальным проблемам экспериментальной кардиологии стали уже традиционными. Пожалуй, главной особенностью очередного, IV симпозиума по метаболизму миокарда является то, что на нем были представлены четыре доклада, суммировавшие результаты совместных экспериментов советских и американских биохимиков и кардиологов. Этот факт является конкретным плодом сотрудничества СССР и США в различных областях кардиологии и вместе с тем он красноречиво свидетельствует о желании ученых обеих стран развивать и углублять научные контакты.

Круг проблем, обсуждаемых на симпозиумах «Метаболизм миокарда», постоянно расширяется. В этом явлении заключена одна из характерных черт наших совместных симпозиумов. Поиск новых перспективных направлений исследований отражает постоянное поступательное движение науки о сердце.

На IV симпозиуме, помимо таких основополагающих вопросов, как энергетический, кальциевый и гормональный метаболизм в сердце, были затронуты актуальные проблемы, касающиеся метаболизма простагландинов и роли перекисного окисления в изменениях физиологических и механических параметров сердца.

Как и в предыдущих монографиях «Метаболизм миокарда», представленные в новом сборнике статьи можно разделить на две группы: биохимико-физиологические исследования и клиничко-морфологические работы. Однако, как заметит читатель, знакомый с содержанием первых трех монографий «Метаболизм миокар-

да», это деление становится все более условным. Это свидетельствует как о высоком методическом и теоретическом уровне кардиологической науки, так и о большом интересе, проявляемом учеными из других областей естествознания к раскрытию тайн работы сердца.

Можно надеяться, что новая советско-американская монография внесет ощутимый вклад в развитие исследований процессов, протекающих в сердце, и путей коррекции нарушений его функции.

Академик Е. И. Чазов

## Часть первая

# РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАЩЕНИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА МИОКАРДА

---

УДК 612.172.015.31:546.41

## КАЛЬЦИЙ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК: ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ МИОКАРДА

Г. А. ЛАНГЕР (G. A. LANGER), К. Д. ФИЛИПСОН (K. D. PHILIPSON),  
Д. М. БЕРС (D. M. BERS) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

Лаборатории сердечно-сосудистых исследований в UCLA в настоящее время проводят изучение локализации и потоков кальция (Ca), которые контролируют развитие напряжения в сердце. В работе используются различные препараты, включая межжелудочковую перегородку, перфузированную через артерию [1], изолированную папиллярную мышцу, перфузированную в ячейке стандартным способом, культуру миокардиальной ткани [2], изолированные препараты сарколеммы, полученные при помощи центрифугирования в градиенте сахарозы [3], и препараты сарколеммы, приготовленные по методу «высокоскоростного газового разделения» из клеток в культуре [4]. Эта комбинация методов использована с целью найти связь между функцией изолированной мембраны и ее компонентов и функцией целой, интактной ткани. В этом сообщении суммируются данные, полученные при помощи указанных методов, касающиеся сопряжения процессов возбуждения — сокращения в сердце.

### ПРЕДПОСЫЛКИ

Давно известно, что для поддержания сокращений сердечной мышцы необходим внесклеточный Ca. Удаление Ca из перфузионной среды приводит к быстрому падению силы сокращений, тогда как в скелетной мышце снижение осуществляется в течение многих минут или часов [5]. Это простой факт ясно демонстрирует главное различие в процессах электромеханического сопряжения в двух тканях и указывает, что быстро обменивающаяся фракция Ca имеет фундаментальное значение для работы сердца. По-видимому, быстро обменивающаяся фракция может локализоваться на клеточной поверхности, и структурный анализ указывает на

некоторые структуры как возможные кандидаты для связывания Са.

Под термином «клеточная мембрана» большинство исследователей подразумевают 7,5 нм двухслойную или триламнарную структуру, которая окружает клетку. В действительности эта структура, обозначенная единицей мембраны, представляет только один компонент всего сарколеммального мембранного комплекса. Более тщательное исследование даже прокрашенных обычным образом электронно-микроскопических срезов обнаруживает «рыхлое» покрытие или слой толщиной 50 нм, расположенный на внешней стороне мембраны [2, 6]. Этот поверхностный слой имеет два компонента: внутренний, менее плотный, толщиной 20 нм и внешний, несколько более плотный, толщиной 30 нм. Полностью это покрытие обозначают различными терминами: фундаментальная мембрана ламина, внешняя ламина, поверхностное покрытие, граничный слой или, по терминологии Беннетта, гликокаликс [7]. Эти термины не подчеркивают того, что покрытие имеет два структурных компонента. Поскольку каждый из них может выполнять отличную от другого функцию, компоненты должны различаться по названиям [8]. Внутреннее покрытие называют поверхностным слоем [ПС], а внешний слой — внешней ламиной [БЛ]. Для обозначения всего комплекса будет использован оригинальный термин Беннетта — гликокаликс.

Гликокаликс находится в контакте с внешней поверхностью клетки, но в миокарде он вместе с мембраной способен к втягиванию, образуя поперечную тубулярную [Т] систему [9, 10]. Как подчеркивают Fawcett и McNutt [11], присутствие гликокаликса используется для идентификации Т-трубочек, находящихся глубоко внутри миокардиальной клетки. Какую бы функцию ни выполняли покрытия, ясно, что они ассоциированы с Т-тубулярной системой так же, как и с внешней клеточной поверхностью. В клетках скелетных мышц гликокаликс не заполняет Т-трубочки [6], а находится только на поверхности. Таким образом, сердечная мышца имеет гораздо большее количество покрывающего материала из расчета на клетку. Он присутствует на всей электрически активной внешней поверхности клеток, включая Т-трубочки.

Гликокаликс на поверхности клеток сливается с основным веществом межклеточного пространства и примыкает к базальной мембране тесно прилегающих капилляров [9]. Frank и Langer [9] показали, что около 36% клеточной поверхности находится практически в прямом контакте с капиллярами. Это свидетельствует, что значительная доля обмена между капиллярами и клетками происходит через область, в которой все межклеточное пространство занято только базальной мембраной и гликокаликсом сердечной клетки. Таким образом, весьма вероятно, что имеется прямой обмен между капилляром и клеткой и что включенные между ними слои базальная мембрана — гликокаликс играют сущест-

венную роль в регуляции этого обмена. В областях, где больше межклеточного пространства, на обмен должны влиять связывание и перенос через эту область, но вещества подвержены тем же влияниям гликокаликса перед входением в клетку и после выхода из нее.

Гликокаликс и основное вещество межклеточного пространства имеют высокую концентрацию фиксированных, отрицательно заряженных участков вследствие присутствия мукополисахаридов, гликопротеинов и гликолипидов. Эти участки обладают сродством к катионам, включая Са. Саркоlemma имеет другую область, которая, возможно, играет главную роль в связывании Са. Это внешняя поверхность мембраны, из которой выдвинуты гидрофильные полярные основания фосфолипидов, также содержащие отрицательно заряженные участки.

Существенным подтверждением того, что связанный этими участками (гликокаликс и фосфолипиды) Са имеет решающее значение в электромеханическом сопряжении, являются эксперименты с трехвалентным редкоземельным ионом — лантаном (La) [2, 8]. Лантан может быть ультраструктурно локализован на гликокаликсе и саркоlemma и не проникает далее внутрь клетки. При его добавлении к сокращающейся сердечной мышце в микромолярных концентрациях он разобщает возбуждение и сокращение. Исследования ионных потоков показывают, что вытеснение Са из клетки совпадает с процессом разобщения. Это свидетельствует о том, что локализованный на поверхностных участках Са (связывание которых с La ограничено) участвует в электромеханическом процессе. Последние исследования в нашей лаборатории ставили целью дальнейшее определение связывания Са саркоlemma и выяснение его роли в процессе электромеханического сопряжения. Эти данные суммированы ниже.

## ИССЛЕДОВАНИЯ НА ФУНКЦИОНИРУЮЩЕЙ ТКАНИ

Philipson и Langer [12] использовали препарат перфузированной межжелудочковой перегородки кролика для изучения кинетики изменений сократимости при уменьшении или увеличении концентрации Са в перфузате.

На рис. 1 отображены изменения в  $dT/dt$  (первая производная напряжения) в зависимости от изменений в  $[Ca]_0$  для перфузированной через артерию межжелудочковой перегородки кролика. В случае (а)  $[Ca]_0$  резко снижалась от 5 мМ до 50 мкМ.  $t_{1/2}$  снижения в  $dT/dt$  составила 48 с. После 7 мин перфузии при 50 мкМ  $[Ca]$  концентрацию Са возвращали снова к 5 мМ (см. «б»), причем  $t_{1/2}$  возврата  $dT/dt$  составляла 11 с, т. е. была в 4,4 раза выше скорости снижения. В случае (б) другая перегородка, перфузированная при  $[Ca]_0 = 1,5$  мМ, ион лантана (200 мкМ) добавлена в указанной на рис. 1 точке.  $t_{1/2}$  снижения  $dT/dt$  составляла 5,1 с. Следует заметить, что скорость падения напряжения при

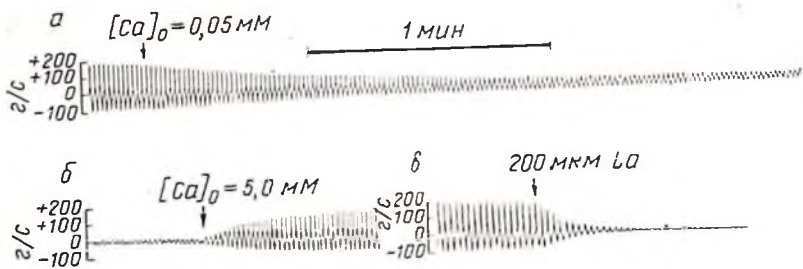
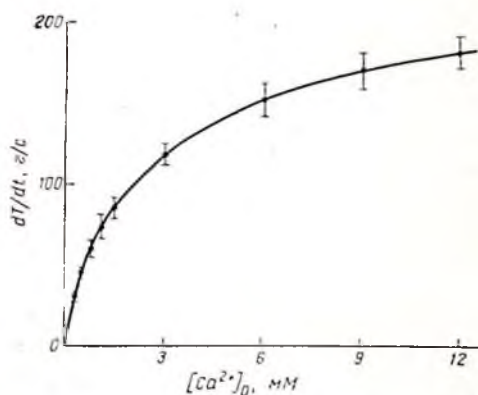


Рис. 1. В месте, указанном стрелкой (а),  $[Ca]_0$  в перфузированной через артерию внутривентрикулярной перегородке снижали от 5 мМ до 0,05 мМ.  $t_{1/2}$  для снижения в  $dT/dt$  (r/c) составляет 48 с. В месте, указанном стрелкой (б),  $[Ca]_0$  увеличивали от 0,05 мМ до 5 мМ.  $t_{1/2}$  для возвращения  $dT/dt$  составляет 11 с, или в 4,4 раза выше скорости снижения в (а). В месте, указанном стрелкой (в), к перегородке перфузированной с  $[Ca]_0 = 1,5$  мМ, добавляли 200 мМ La.  $t_{1/2}$  снижения  $dT/dt$  составляет 5,1 с. Обсуждение в тексте (Воспроизводится с разрешения J. Mol. cell. Cardiol.).

удалении Ca значительно ниже, чем подъем после замещения, и что при добавлении лантана, Ca-замещающего агента, происходит значительно более быстрое снижение, чем при удалении Ca. Эти результаты согласуются с предположением о том, что Ca, обеспечивающий сопряжение, в соответствии с определенным средством должен быть связан в участках быстрого обмена, откуда он мог бы диссоциировать менее быстро, чем снова связываться после восстановления доступности этих участков для Ca. В этом случае можно было бы ожидать, что добавление La, но не, конкурирующего с Ca за места связывания и замещающего Ca, будет более эффективным, чем удаление Ca из перфузата. Результаты не согласуются с предположением о том, что исследуемая форма Ca существует в свободном растворе в межклеточном пространстве. Если бы это было так, то скорости падения и восстановления напряжения были бы одинаковыми и зависели просто от скорости обмена в межклеточном пространстве.

Дальнейшее исследование роли связанного Ca в функционирующей ткани можно проводить, основываясь на допущении, что  $dT/dt$  пропорционально количеству Ca, связанного с участками, которые его высвобождают для активации сокращения. На рис. 2 показана зависимость между  $dT/dt$ , или связанным Ca и концентрацией Ca в перфузате. Это отношение может быть графически представлено как  $dT/dt$ ,  $[Ca]_0$  против  $dT/dt$ , что, согласно допущению выше, эквивалентно отношению Ca связанный/Ca свободный против Ca связанного. Последняя зависимость, представленная в координатах Скэтчарда [13], иллюстрирована на рис. 3. Это соотношение не линейно и может быть преобразовано в два компонента, отображающих два класса связывающих участков: один — высокого сродства ( $K_a = 3800 M^{-1}$ ) и другой — более низкого ( $K_a = 270 M^{-1}$ ). Относительный размер каждого

Рис. 2. Отношение между  $dT/dt$  и  $[Ca]_0$  в перфузированной через артерию межжелудочковой перегородке. Вертикальные черточки — стандартная ошибка среднего (Воспроизводится с разрешения J. Mol. Cell. Cardiol.).



компонента дается пересечением на абсциссе и указывает, что количество участков связывания с низким сродством приблизительно на порядок выше, чем высокоаффинных связывающих участков.

Вышеупомянутый анализ подтверждает существование быстрообменивающихся клеточных участков связывания Ca, а также то, что Ca в этих участках важен для регуляции развития напряжения миокардом. Исследования, проведенные недавно на другом типе функционирующей ткани, а именно на культуре миокардиальной ткани, дают дальнейшее подтверждение поверхностного связывания и новой концепции компартиментализации Ca [14].

В настоящем исследовании на культуре клеток обнаружено, что около 90% Ca обменивается со скоростью, аналогичной подаче Ca при перфузии, и фактически весь этот Ca замещается La. Этот быстро обменивающийся компонент составляет 42% от всего клеточного Ca. Остаток Ca обменивается очень медленно, другими словами, не обнаруживается обмена на протяжении 1—2 ч. Клетки увеличивали количество обменивающегося Ca на 65% при повышении температуры от 24° до 35°C, что также увеличивало частоту сокращений от 85 до 145 в минуту. Весь этот дополнительный Ca обнаруживался в быстрообменивающемся комплексе и замещался La. Он был, следовательно, распределен на клеточной поверхности. Кинетические данные указывают, что Ca, который необходим для сокращения, входит в клетку, но не обменивается с внутриклеточными участками или обменивается очень медленно по сравнению с участками, расположенными на поверхности клетки. Обе модели согласуются с этими результатами на культуре клеток: 1) Ca высвобождается для сократительных белков из комплекса саркоlemma — гликокаликс, активирует сокращение и снова связывается этими поверхностными структурами; 2) меньшее количество Ca высвобождается из комплекса саркоlemma — гликокаликс и запускает высвобождение [15] Ca из субсарколеммальных саркотубулярных цистерн. Этот Ca затем активирует миофиламенты и снова связывается поверхностными



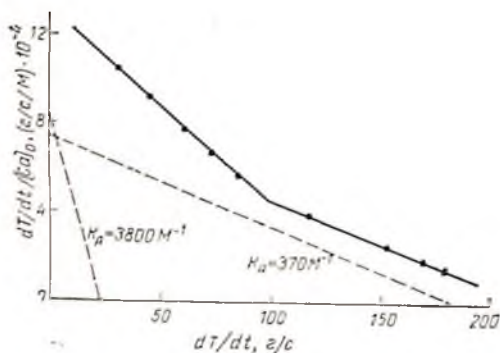


Рис. 3. Данные рис. 2 в координатах Скэтчарда. Принято, что  $dT/dt$  эквивалентно связанному Са в местах высвобождения. Таким образом, в скэтчардовских координатах представлено:  $Ca_{связан}/Ca_{своб}$  в зависимости от Са связанного. Обнаруживаются два компонента, отображающие два класса связывающих участков с  $K_d = 3800 M^{-1}$  и  $370 M^{-1}$ . Количество участков, ассоциированных с каждым компонентом, определяется пересечением каждого компонента с абсциссой. Видно, что количество низкоаффинных связывающих участков приблизительно в 10 раз больше, чем участков с высоким средством (Воспроизводится с разрешения J. Mol. cell, Cardiol.).

участками или внутри цистерн. С этой точки зрения невозможно установить, какая из моделей работает в этих клетках. Однако следует заметить, что если поверхностный Са запускает высвобождение из внутренних мест хранения, то поверхностный Са и хранящийся внутри клеток Са функционально неразличимы. Это следует из того факта, что время, необходимое для возвращения к полной амплитуде сокращения (5 с) после экспозиции при 0  $[Ca]_0$ , не зависит от времени экспозиции клеток при 0  $[Ca]_0$ . Поэтому можно предположить, что поверхностный и хранящийся внутри клеток Са захватываются с одинаковой скоростью. Два компонента также неразличимы кинетически при примененных условиях перфузии. Весь обменивающийся клеточный Са обменивается с той же скоростью, с какой перфузат достигает клеток. Нет свидетельств существования более медленно обменивающегося компонента значительного размера, поэтому можно предположить, что поверхностные и обменивающиеся внутренние запасы (если они имеются) обмениваются с одинаковой скоростью.

Результаты, характеризующие связывание Са, полученные на функционирующих тканях, должны быть скоррелированы с результатами, полученными на изолированных мембранах.

### ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННОЙ МЕМБРАНЫ

Препараты сарколеммы получали из желудочковой мышцы кролика по методу Bers [3]. По этому методу выделяются препараты, обогащенные в 10—15 раз (по сравнению с гомогенатом) сарколеммальными маркерами  $K^+$ -зависимой р-нитрофенилфосфа-

тазой, Na, K-АТФ-азой и сialовой кислотой. Загрязнения митохондриями (измеряемые по активности сукцинатдегидрогеназы) и саркоплазматическим ретикулумом (измеряемые по активности Са, Mg-АТФ-азы) были минимальными. Метод включает экстракцию раствором KCl низкой ионной силы (0,3 M) и центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Сарколеммальные мембраны собирают при плотности около 1,11 г/мл (27% массы/масса сахарозы). Затем их центрифугируют при 180 000 g в течение 90 мин и осадок ресуспендируют в 5 мМ трис-HCl (pH 7,6 при 20°C) для проведения экспериментов.

Связывание кальция. Исследование связывания ионов проводили с использованием метода фильтрования через миллиметровые фильтры [16]. На рис. 4 показана зависимость: связанный сарколеммой Са или  $dT/dt$  от  $[Ca]_0$  в присутствии 140 мМ натрия (изменения в  $[Na]_0$  будут обсуждаться ниже). Отношение  $dT/dt$  к  $[Ca]_0$  взято из рис. 2. Необходимо отметить, что обе кривые в большей части налагаются одна на другую. Это демонстрирует отличную корреляцию между количеством связанного сарколеммой Са и сокращаемостью всей ткани миокарда из желудочка сердца кролика. Как и предполагалось, график в скэтчардовских координатах (связанный сарколеммой Са/ $[Ca]_0$  в зависимости от связанного Са) практически идентичен графику, представленному на рис. 3 и демонстрирует наличие двух классов связывающих участков. Максимальное количество сарколеммальных участков связывания Са составляет около 270 нмоль/мг белка. Зная количество миллиграммов белка в 1 г сырой массы (около 120) и фактор очистки сарколеммальной фракции (приблизительно в 15 раз), можно произвести оценку сарколеммального связывания во всей ткани. Эта величина 2,2 ммоль связанного Са на 1 кг сырой массы в 20 раз превышает количество, необходимое для насыщения участков миофиламентов и обуславливающее развитие максимальной силы сокращений [17].

В другой серии экспериментов исследовали связь между связанным сарколеммой Са и силой сокращения. Много лет уже известно, что уровень внешнего натрия  $[Na]_0$  оказывает существенное влияние на силу сокращений [18]. Tillisch и соавт. [19] было проведено тщательное измерение изменений сокращений в ответ на перфузию при  $[Na]_0$  в диапазоне между 75 и 200 мМ. Начальное изменение силы, следующее сразу же за изменением  $[Na]_0$ , вероятнее всего объясняется конкуренцией за места связывания Са на сарколемме. Таким образом, действие различных  $[Na]_0$  на связанный изолированной сарколеммой Са сравнялся с эффектом различных  $[Na]_0$  на изменение силы сокращений желудочка сердца кролика. На рис. 5 представлен график, отображающий эту зависимость, где за 100% принято количество связанного Са, или порядок силы сокращения при  $[Na]_0 = 142$  мМ. Как видно из графика, кривые в двойной шкале совпадают. Это является еще одним подтверждением, что связанный сарко-

245972  
109972  
Самаркандского  
Здоровья

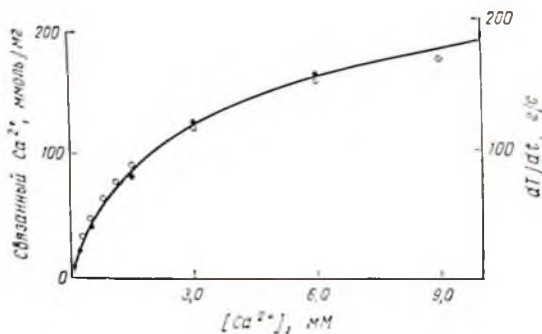


Рис. 4. Сравнение изменений связанного сарколеммальной фракцией Ca из желудочка кролика (левая ордината, темные кружки) с  $dT/dt$  (правая ордината, светлые кружки) относительно концентрации кальция в перфузате  $[Ca^{2+}]$ . Величины зависимости  $dT/dt$  от  $[Ca]$  взяты из рис. 2. Инкубационная среда для сарколеммы и перфузата содержала 140 мМ Na. Видно, что кривые в основном совпадают, что свидетельствует об отличной корреляции между связанным сарколеммой Ca и сократимостью функционирующего желудочка кролика (Воспроизводится с разрешения Am. J. Physiol.).

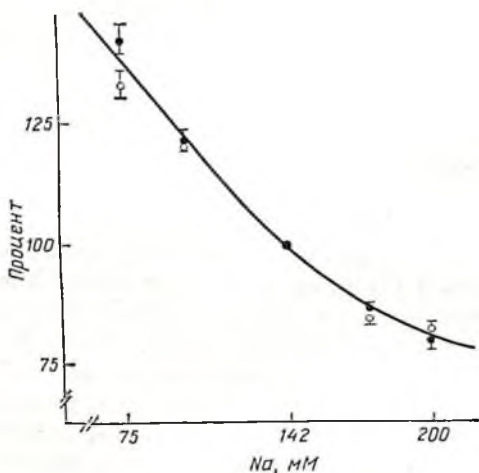


Рис. 5. Сравнение уровня Ca, связанного с сарколеммальной фракцией, выделенной из желудочка кролика при различных концентрациях натрия (темные кружки), с амплитудой пикового изменения напряжения, которое происходит в ответ на изменение  $[Na]_0$  в папиллярной мышце кролика (светлые кружки) (данные из работы Tillisch и соавт. [19]). Данные выражены в процентах от контрольных величин, полученных при  $[Na]_0 = 142$  мМ. Кривые практически совпадают, что свидетельствует о том, что действие Na на связанный сарколеммой Ca является основным фактором в контроле развития напряжения (Воспроизводится с разрешения Am. J. Physiol.).

леммой Са играет критическую роль в контроле сокращений миокарда в сердце млекопитающих.

Недавно была завершена третья серия экспериментов, направленных на исследование сарколеммального Са. Эта серия выясняет корреляцию между эффектами катионных разобщителей электромеханического сопряжения в функционирующей сердечной мышце и Са, который связан с изолированными мембранами, выделенными из той же ткани (желудочки неонатальных крыс). Кроме того, исследования по связыванию Са при помощи анализа Скэтчарда продемонстрировали два класса участков по характеристикам, сходным с полученными для желудочков кролика. Способность серии двух- и трехвалентных катионов ( $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$  и  $Y^{3+}$ ) вытеснить Са с поверхности мембран измерялась и сравнивалась со способностью этих катионов к разобщению электромеханического сопряжения в интактном желудочке. По способности к вытеснению и разобщению эти катионы располагались в совершенно одинаковые ряды. Наиболее мощными замещающими агентами и разобщителями были катионы с гидратированными ионными радиусами, близкими по размерам радиуса Са (0,099 нм). Таким образом, эти результаты показывают, что селективность сарколеммальных участков связывания Са аналогична последовательности эффективного разобщения. Кроме того, снова было подтверждено, что количество связанного Са было во много раз выше, чем это необходимо для развития напряжения. Выводы также согласуются с предположением о том, что связанный сарколеммой Са контролирует количество Са, доступного сократительным белкам и, следовательно, необходимо для сокращения.

Суммируя, отмечаем поразительную положительную корреляцию между независимым от энергии связыванием Са и уровнем силы сокращений в миокарде млекопитающих. Необходимо выяснить также, какие компоненты сарколеммального комплекса ответственны за связывание. По предварительным данным можно предположить, что наибольшее значение в этом процессе могут иметь фосфолипиды.

## МОДЕЛЬ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ

Проведенные исследования убедительно подтверждают, что Са, связанный комплексом сарколемма — гликокаликс, чрезвычайно важен в ионном контроле сокращений миокарда. Эта работа наряду с другими исследованиями, проводимыми на протяжении 10—15 лет, позволила разработать умозрительную модель движения Са в процессе электромеханического сопряжения. Схема этой модели показана на рис. 6.

Непосредственным источником Са, который активирует и контролирует силу сокращений, является Са, связанный с участками на поверхности, включая гликокаликс (внешняя ламина + поверх-

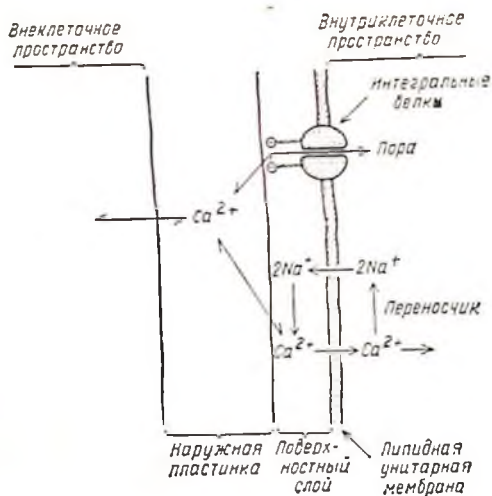


Рис. 6. Модель для трансмембранного переноса  $\text{Ca}$ .  $\text{Ca}$  связывается отрицательно заряженными участками внешней ламинны и поверхностного покрытия. Эти участки находятся в состоянии быстрого равновесия с  $\text{Ca}$  в межклеточном пространстве. Они снабжают  $\text{Ca}$ , который переносится через саркодему по двум путям: 1) через систему пор, образованную интегральным белком бислоя; этот перенос должен быть электрогенным; 2) при помощи носителя (сопряженно с переносом  $\text{Na}$  из клетки) таким образом, что перенос через эту систему должен быть электронейтральным. Более подробное описание в тексте (Воспроизводится с разрешения Internat. Rev. of Physiology, Copyright 1976 Univ. Park Press, Baltimore, Md.).

ностное покрытие) и гидрофильные окончания фосфолипидов бислоя (на рис. 6 не показано).  $\text{Ca}$ , связанный этими структурами, находится в состоянии быстрого равновесия с  $\text{Ca}$  сосудов и межклеточного пространства. Он снабжает по крайней мере две системы, которые осуществляют контакт в области гликокаликса — бислоя липидов. Система, обозначенная «поры», смоделирована на основе подвижно-мозаичной концепции строения мембран [20], в соответствии с которой интегральные белки «плавают» в липидном бислое и, взаимодействуя, образуют гидрофильные каналы, или поры. Очевидно, эти поры функционируют как селективные каналы для электрогенного движения ионов, включая  $\text{Ca}$ . Движение ионов через эту систему может быть зарегистрировано при помощи метода фиксации потенциала. Максимальное количество  $\text{Ca}$ , которое продвигается внутрь через эту систему с каждым возбуждением, составляет 5—10 мкмоль на 1 кг сырой массы [21]. Этого вполне достаточно для подъема внутриклеточной концентрации свободного  $\text{Ca}$  до механического порога.

Другая система, обозначенная «носитель», основана на данных экспериментов, в которых исследовали взаимодействие  $\text{Na}$  и  $\text{Ca}$  [19, 22—24]. Движение носителя приводит к транспорту  $\text{Na}$  из клетки и  $\text{Ca}$  внутрь клетки без изменения общего заряда; та-

ким образом, это не является электрогенным процессом. Наиболее просто представить себе активацию носителя можно в терминах мобилизации большого количества молекул с указанными характеристиками транспорта Na и Ca. Поскольку в физиологических условиях  $[Ca]_0$  и  $[Na]_0$  довольно постоянны и поскольку  $[Ca]_i$  находится под контролем саркоплазматического насоса Ca, уровень  $[Na]_i$ , возможно, является доминантным сигналом в определении активности системы носителя. Вмешательства, которые приводят к повышению  $[Na]_i$  (внезапное увеличение частоты сокращений, введения дигиталиса), будут стимулировать носитель к переносу Na из клетки и Ca внутрь клеток (см. рис. 6). Движение Ca внутрь ответственно тогда за положительный инотропизм, который следует за воздействием, приводящим к повышению  $[Na]_i$ .

Работа носителя против концентрационного градиента  $a$  обеспечивается, вероятно, за счет энергии градиента концентраций Ca между наружной и внутренней сторонами клетки. Этот градиент составляет приблизительно  $10^4$  при диастоле  $2 \cdot 10^2$  при пике сокращения. Движение Ca внутрь в сторону уменьшения его концентрационного градиента должно быть связано энергетически с движением  $a$  наружу, против его градиента.

Существуют противоречивые мнения по поводу того, способен ли Ca, происходящий из поверхностных участков, проходить прямо к миофиламентам или же субпороговые количества направляются к саркоплазматическому ретикулуму, что приводит к высвобождению его больших количеств [25, 26]. Однако общепринято, что определенное количество Ca, которое входит в клетку в ответ на возбуждение, вызывает вполне определенный сократительный ответ. Таким образом, поверхностно-связанный Ca является критическим фактором в полном контроле сокращений миокарда, независимо от того, осуществляет ли он этот контроль прямой активацией или вызывает высвобождение Ca из саркоплазматической системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rau E. E., Shine K. I., Langer G. A. Potassium exchange and mechanical performance in anoxic mammalian myocardium.—Am. J. Physiol., 1977, 232, H85—H194.
2. Langer G. A., Frank J. S. Lanthanum in heart cell culture: Effect on calcium exchange correlated with its localization.—J. cell. Biol., 1972, 54, 441—445.
3. Bers D. M., Langer G. A. Uncoupling cation effects on cardiac contractility and sarcolemmal  $Ca^{2+}$  binding.—Am. J. Physiol. Submitted.
4. Langer G. A., Frank J. S., Philipson K. D. Preparation of sarcolemmal membrane from myocardial tissue culture monolayer by "high velocity gas dissection".—Science, 1978, 200, 1388—1391.
5. Rich T. L., Langer G. A. A comparison of excitation-contraction coupling in heart and skeletal muscle.—J. Mol. cell. Cardiol., 1975, 7, 747—765.
6. McNutt N. S., Fawcett D. W. Myocardial ultrastructure.—In: The Mammalian Myocardium /Eds. G. A. Langer, A. J. Brady. New York: Wiley, 1974, pp. 1—49.

7. Frank J. S., Langer G. A., Nudd L. M., Scraydarian R. The myocardial cell surface, its histochemistry and the effect of sialic acid calcium removal on its structure and cellular ionic exchange.—*Circulat. Res.*, 1977, 41, 702—714.
8. Frank J. S., Langer G. A. The myocardial interstitium: Its structure and its role in ionic exchange—*J. cell. Biol.*, 1974, 60, 586—601.
9. Langer G. A., Frank J. S., Brady A. J. The myocardium.—In: *Cardiovascular Physiology II: International Review of Physiology/* Eds. A. C. Guyton, A. W. Cowley, Baltimore, MD: University Park Press, 1976, v. 9, pg. 191—237.
10. Fawcett D. W., McNutt N. S. The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle.—*J. cell. Biol.*, 1974, 60, 586—601.
11. Philipson K. D., Langer G. A. Sarcolemmal bound calcium and contractility in the mammalian myocardium.—*J. Mol. cell. Cardiol.* In press.
12. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, 51, 660—672.
13. Langer G. A., Frank J. S., Nudd L. M. Correlation of calcium exchange, structure and function in myocardial tissue culture.—*Am. J. Physiol.* Submitted.
14. Fabiato A., Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.—*J. Physiol.* (London), 1975, 249, 469—495.
15. Philipson K. D., Bers D. M., Nishimoto A. Y., Langer G. A. The binding of calcium and sodium to sarcolemmal membranes: Relation to control of myocardial contractility.—*Am. J. Physiol.* Submitted.
16. Solaro R. J., Wise R. M., Shiner J. S., Briggs F. N. Calcium requirement for cardiac myofibrillar activation.—*Circulat. Res.*, 1974, 34, 525—530.
17. Daly I. deB., Clark A. J. The action of ions upon the frog's heart.—*J. Physiol.* (London), 1921, 54, 367—383.
18. Tillisch J. H., Fung L. K., Hom P. M., Langer G. A. Transient and steady-state effects of sodium and calcium on myocardial contractile response.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1979, 11, 137—148.
19. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.—*Science*, 1972, 175, 720—731.
20. New W., Trautwein W. Inward currents in mammalian myocardium.—*Pflüg. Arch.*, 1972, 334, 1—23.
21. Lüttgau H. C., Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart.—*J. Physiol.* (London), 1958, 143, 486—505.
22. Niedergerke R. Movements of Ca in frog ventricles at rest and during contractions.—*J. Physiol.* (London), 1963, 167, 515—550.
23. Tillisch J. H., Langer G. A. Myocardial mechanical responses and ionic exchange in elevated sodium perfusate.—*Circulat. Res.*, 1974, 34, 40—50.
24. Fabiato A., Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1978, 307, 491—522.
25. Langer G. A. The structure and function of the myocardial cell surface.—*Am. J. Physiol.*, 1978, 235, II 461—II 468.

## ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ $Ca^{2+}$ В СОКРАЩАЮЩИХСЯ МЫШЦАХ

Д. Р. БЛИНКС (J. R. BLINKS), В. Г. ВИР (W. G. WIER),  
К. В. СНУДОУН (K. W. SNOWDOWNE) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время признается, что быстрые измерения концентрации  $Ca$  в клетке играют центральную роль в регуляции сократительной активности мышцы. Однако многое в механизмах, ответственных за контроль концентрации кальция, т. е.  $[Ca^{2+}]$  в различных типах мышцы, а в ряде случаев и в деталях взаимосвязи между внутриклеточной  $[Ca^{2+}]$  и механической активностью остается невыясненным. Несомненно, что более полное понимание роли потоков  $Ca$  в регуляции функции мышцы будет определяться в конечном счете нашей способностью их измерить и связать с механическим поведением мышцы. В идеальном случае желательно измерить концентрацию  $Ca$  не только в каждый данный момент во время единичного сокращения, но и от одной точки к другой в отдельной клетке. Пока наиболее обещающим инструментом для получения подобной информации является экворин — кальцийчувствительный биолюминесцентный белок.

Экворин, который можно экстрагировать из люминесцирующей медузы *Aequorea forskalea*, был впервые выделен и охарактеризован Shimomura и соавт. в 1962 г. [1]. Они обнаружили, что экворин отличается от всех ранее известных биолюминесцирующих систем тем, что в люминесцентной реакции участвует единственный органомолекулярный тип — белок с молекулярной массой 21 000 [2] и тем, что на излучение не влияет присутствие свободного  $O_2$ . Более того, поскольку скорость люминесцентной реакции оказалась высокочувствительной к концентрации свободного  $Ca^{2+}$ , было предположено еще в 1963 г. [3], что экворин можно с успехом применять в качестве индикатора биологического  $Ca^{2+}$ . С этого момента он был с успехом использован как индикатор внутриклеточного  $Ca^{2+}$  по крайней мере в 25 различных типах клеток [4], включая поперечные мышцы позвоночных. В данном сообщении описаны результаты, полученные с единичными волокнами скелетной мышцы лягушки и сердечной мышцы млекопитающего.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экворин вводили в единичные живые «быстрые» волокна, отделенные от *mm. tibialis anterior* и *semitendinosus* лягушек *Rana pipiens* и *temporaria* и многоклеточных тяжелей, изолированных из-



системы Пуркинье правых желудочков собак. Волокна мышц лягушек помещали (при 21°C, если не указано специально) в раствор Рингера для амфибий, содержащий (мМ): NaCl 115; KCl 2,5; CaCl<sub>2</sub> 1,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,15; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,85; MgCl<sub>2</sub> 2,0. Этот раствор был уравновешен с комнатным воздухом и имел pH 7,2. Волокна Пуркинье изучали при 35°C в растворе, содержащем (мМ) NaCl 123; KCl 5,4; CaCl<sub>2</sub> 2,7; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42; NaHCO<sub>3</sub> 23,8; MgCl<sub>2</sub> 1,0; глюкозу 5,5. В данном случае раствор был уравновешен 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> и имел pH 7,4.

Экворин был экстрагирован, очищен и приготовлен для инъекций в соответствии с описанной в деталях техникой [5]. Он был растворен до концентрации от 1 до 5 мг/мл в растворе, содержащем 150 мМ KCl и 5 мМ буфер HEPES, pH 8,0. Этот раствор помещали в микропипетки, вытянутые из стеклянных капилляров с помощью нити из того же стекла, вставленной внутрь для облегчения наполнения кончика. Для определения момента внедрения кончика в клетку измеряли потенциал между электродом и омывающим раствором. Экворин вводили в клетку под давлением газа от 1 до 10 атм.

Светоиспускание регистрировали с помощью фотоумножителя ЕМТ 9635В, сокращение — с помощью калиброванного преобразователя напряжения АМЕ, модель АЕ. Детали метода изложены ранее [5—9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Скелетная мышца лягушки

После введения экворина в изолированное волокно скелетной мышцы лягушки наблюдается очень низкий уровень люминесценции, излучаемой покоящимся волокном. В этом случае необходимо использовать фотоумножитель очень высокой чувствительности; кроме того, особое внимание должно быть уделено конструкции прибора с целью оптимизации оптической геометрии и сведения до минимума генерации света от внешних источников. Для преобразования измеренного светонизлучения от мышечного волокна в концентрацию Ca<sup>2+</sup> мы использовали калибровочные кривые, подобные той, которая представлена на рис. 7 (определена *in vitro*). На этом рисунке для обеих осей использован логарифмический масштаб. Концентрация свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, установленная как простыми разбавлениями CaCl<sub>2</sub>, так и с помощью Са-ЭГТА буферов, отложена на горизонтальной оси. Максимальные величины световых ответов, зарегистрированных при смешивании одних и тех же количеств экворина с растворами Ca<sup>2+</sup> различной концентрации, отложены на оси ординат. Все величины выражены как части  $\left(\frac{L}{L_{\text{макс.}}}\right)$  от максимальной интенсивности при высокой (насыщающей) концентрации Ca<sup>2+</sup>. Таким способом

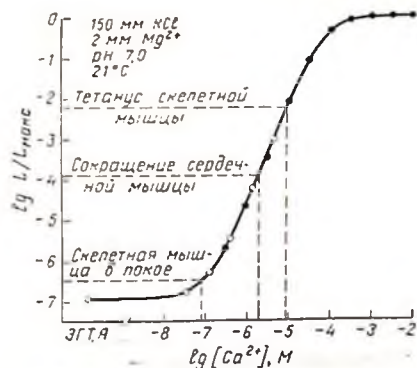


Рис. 7. Калибровочная кривая для экворина, определенная *in vitro*. Двойная логарифмическая зависимость. Точки представляют экспериментальные измерения максимальной интенсивности света при введении стандартных количеств экворина с известной концентрацией свободных ионов кальция. Все значения выражены как части  $L_{\text{макс}}$ , пиковой интенсивности, полученной в растворах с насыщающей  $[Ca^{2+}]$  (частичная люминесценция). Темные кружки — точки, для которых  $[Ca^{2+}]$  была установлена простым разбавлением, светлые кружки — точки, для которых использовали кальций-ЭГТА буферы. Все растворы содержали 150 mM KCl и 2 mM свободного  $Mg^{2+}$  и были забуферены до pH 7,0 5 mM PIPES. Общая концентрация ЭГТА в кальций-ЭГТА буферах составляла 1 mM. Точка, обозначенная над надписью ЭГТА, содержала 1 mM ЭГТА и не содержала добавленного кальция. Пунктирные линии обозначают оценки частичной люминесценции в клетках мышц со введенным экворинном (детали см. в тексте). Взято в измененном виде из [9], детали метода см. в [10].

все измерения интенсивности света были нормированы относительно количества экворина в системе. Можно заметить, что калибровочная кривая очень крута в своей средней части (максимальный наклон = 2,5) и что при очень низких концентрациях  $Ca^{2+}$  кривая становится горизонтальной, т. е. уровень света не зависит от  $[Ca^{2+}]$  [10]. Следует также подчеркнуть, что положение кривой весьма чувствительно к ионной силе и  $Mg^{2+}$  [5]; кривая на рис. 7 была определена в условиях, предположительно соответствующих саркоплазме скелетной мышцы лягушки. Для того чтобы использовать подобного рода калибровочные кривые для оценки концентраций  $Ca^{2+}$  в клетках с введенным экворинном, необходимо оценить  $L_{\text{макс}}$  — максимальную интенсивность света, при которой весь экворин в клетке был бы доступен  $Ca^{2+}$  в насыщающей концентрации. Поскольку измерить истинное количество экворина, выделяющееся из микрошпательки при инъекции, не представляется возможным, мы оцениваем  $L_{\text{макс}}$  путем быстрого лизиса клетки и измерения в присутствии  $Ca^{2+}$  общей интенсивности излучения света поглощенным клеткой экворинном [9]. Такой подход, используемый нами, проиллюстрирован на рис. 8. Для определения интенсивности световозлучения из клеток с введенным экворинном как при покое, так и во время активного со-

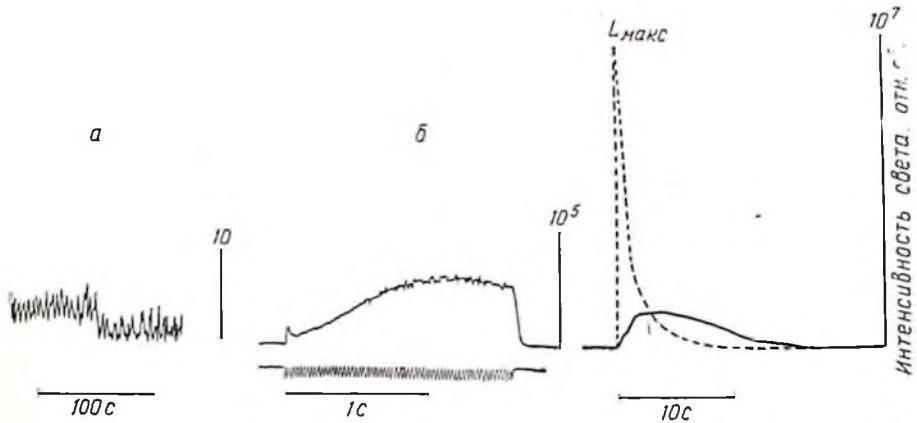


Рис. 8. Метод, использованный для оценки частичной люминесценции

$\left( \frac{L}{L_{\text{макс}}} \right)$  в клетках мышц с введенным экворинном.

а — запись светового сигнала от фотоумножителя, интактное покоящееся мышечное волокно; б — световой сигнал от волокна во время тетанического сокращения (50 Гц); в — световой сигнал в условиях, когда в среду иприскивали 0,5% тритон X-100 для разрядки всего экворина клетки. Пунктирная линия ограничивает ту же площадь, что и область под экспериментальной кривой. Эта линия показывает изменение света во времени, которое наблюдалось бы в случае внезапного экспонирования экворина в клетке кальцием в насыщающей концентрации. Максимум этой кривой является лучшей оценкой  $L_{\text{макс}}$ , полученной нами для количества экворина в клетке. Все три изменения интенсивности света должны быть выполнены в идентичных оптических условиях и при той же температуре, что и в случае калибровочной кривой (см. рис. 7). Следует обратить внимание на различные шкалы интенсивности, света и времени на рисунках а, б и в.

стояния, клетки быстро помещали в раствор, содержащий детергент, например тритон X-100. Излучаемый свет, который должен быть измерен при уменьшенной чувствительности фотоумножителя, суммируется в течение периода (обычно более 30 с), необходимого для полной разрядки экворина. Наша лучшая оценка  $L_{\text{макс}}$  является произведением этого интеграла и константы скорости для потребления экворина (определенного *in vitro*) в присутствии насыщающей  $[Ca^{2+}]$  при температуре эксперимента. По существу это равно пику интенсивности света воображаемой записи светового сигнала, охватывающей ту же площадь, что и экспериментальная кривая, но имеющей такое течение во времени, которое наблюдается при быстром смешивании образца экворина с насыщающей концентрацией  $Ca^{2+}$ . (При этом подразумевается, что полное количество света, излучаемого данной aliquотой экворина, не зависит от скорости смешивания  $Ca^{2+}$  и что детергент, используемый для лизиса клетки, не изменяет световой выход. Оба этих предположения после экспериментальной проверки оказались обоснованными.) В 12 опытах среднее значение  $\lg \frac{L}{L_{\text{макс}}}$

для несомненно здоровых волокон скелетной мышцы лягушки в состоянии покоя (21°C) составляло 6,5. Это лишь незначительно выше кальцийнезависимого излучения света экворинном в присутствии 150 мМ KCl и 2 мМ  $Mg^{2+}$  (см. рис. 7). Для проверки того, что

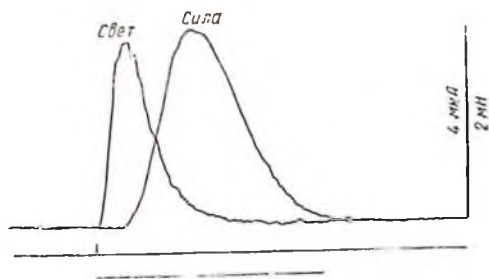


Рис. 9. Люминесцентный и механический ответы при изометрическом одиночном сокращении волокна скелетной мышцы лягушки с введенным экворином. Волокно было отделено от мышцы *tibialis anterior* лягушки *Rana temporaria*. Сокращения с редкой частотой, температура 21 °С, длина саркомера 2,4 мкм. Инъекции производили во многих участках волокна. Момент раздражения обозначен вертикальной линией на нижней части рисунка.

излучение света от покоящегося волокна действительно выше кальцийнезависимого уровня, важно показать, что можно снизить свечение при добавках, способных уменьшить внутриклеточный  $[Ca^{2+}]$ . Это было сделано либо путем удаления  $Ca^{2+}$  из омывающей среды с помощью ЭГТА (свободный  $Mg^{2+}$  поддерживается на постоянном уровне в 2 мМ) или заменой  $Ca^{2+}$  в растворе Рингера на  $Sr^{2+}$ . На калибровочной кривой рис. 7 среднее свечение при покое соответствует концентрации свободных ионов  $Ca$  около  $8 \cdot 10^{-8}$  М.

При стимуляции волокон скелетных мышц после введения в них экворипа интенсивность света, излучаемого ими, быстро возрастает в 10000 раз или более. Один из примеров светового сигнала, записанного во время единичного сокращения, представлен на рис. 9. Для облегчения сравнения двух сигналов по времени записи выхода фотомножителя и кривая напряжения наложены на этом рисунке друг на друга. Видно, что световой сигнал возникает сразу после стимула и сопровождается более плавным увеличением напряжения. При 21 °С интенсивность света достигает максимума значительно раньше момента развития максимального напряжения, и к моменту достижения пикового напряжения световой сигнал приближается к уровню, характерному для состояния покоя.

Следует с осторожностью отнестись к интерпретации регистрации процессов, подобных этому. Во-первых, способность эквориновой реакции следовать за быстрыми изменениями в  $[Ca^{2+}]$  ограничена [11]. Хотя кинетика эквориновой реакции и не изучена в достаточных деталях для точной развертки светового сигнала, можно предположить, что увеличение интенсивности света несколько запаздывает за увеличением концентрации ионов  $Ca$ . Во-вторых, наличие крутого участка в средней части кривой за-

зависимости интенсивного света от  $[Ca^{2+}]$  означает, что изменения интенсивности света в этом диапазоне могут создать обманчивое впечатление об изменениях  $[Ca^{2+}]$ , ответственных за них. В средней части кривой интенсивность света изменяется примерно пропорционально  $[Ca^{2+}]^{2.5}$ ; 10 000-кратное изменение интенсивности света при этом соответствует приблизительно лишь 40-кратному изменению  $[Ca^{2+}]$ . В-третьих, крутизна кривой концентрация Са — эффект обуславливает появление другого затруднения при интерпретации, а именно того, что в световых сигналах будут доминировать те области клеток, в которых концентрация  $Ca^{2+}$  наиболее высока. Иными словами, данное количество  $Ca^{2+}$  вызовет большую эмиссию света тогда, когда имеется его высокая локальная концентрация по сравнению с тем случаем, когда он распределен равномерно во всей клетке. Это, вероятно, является существенным фактором в генерации светового сигнала во время одиночных сокращений скелетной мышцы, так как почти наверняка при этом возникают значительные градиенты  $Ca^{2+}$ . Ионы Са, по всей видимости, высвобождаются довольно быстро из терминальных цистерн саркоплазматического ретикулума; затем они должны диффундировать, минуя различные потенциальные места захвата (например, саркоплазматический ретикулум, парвалльбулин, митохондрии), перед тем как достигнут тропоина С в миофибриллах. Поэтому кажется вероятным, что эквириповый сигнал при одиночном сокращении соответствует временному повышению концентрации Са в непосредственной близости от места высвобождения этого иона. Таким образом, изменения амплитуды сигнала являются, вероятно, хорошим показателем изменений количества высвобождающегося  $Ca^{2+}$ , хотя из этого не следует правомерность попытки оценить при одиночных сокращениях даже среднюю внутриклеточную  $[Ca^{2+}]$  методом, примененным ранее для волокна, находящегося в состоянии покоя.

Более благоприятна ситуация при тетанических сокращениях, когда устойчивый уровень светонизлучения может быть поддержан в течение сотен миллисекунд (рис. 10). При подобных стационарных условиях насыщаемые места связывания Са уравниваются Са в цитоплазме, а значительные градиенты  $[Ca^{2+}]$  вряд ли существуют на расстояниях, больших, чем длина одного саркомера. При реализации подобных условий вполне оправданной кажется попытка оценить внутриклеточную концентрацию свободного  $Ca^{2+}$ . Мы определили, что во время фазы плато тетануса при 21°C среднее значение  $L_{\text{макс}}$  составляет —2,2; это соответствует на кривой рис. 7 концентрации Са чуть ниже  $10^{-5}$  М. Таким образом, мы можем заключить, что при тетанусе концентрация свободных ионов Са возрастает от уровня несколько ниже  $10^{-7}$  М до почти  $10^{-5}$  М. Это приблизительно является диапазоном, в котором изменения в  $Ca^{2+}$  влияют на развитие напряжения в скапированных скелетных и сердечных волокнах [12].

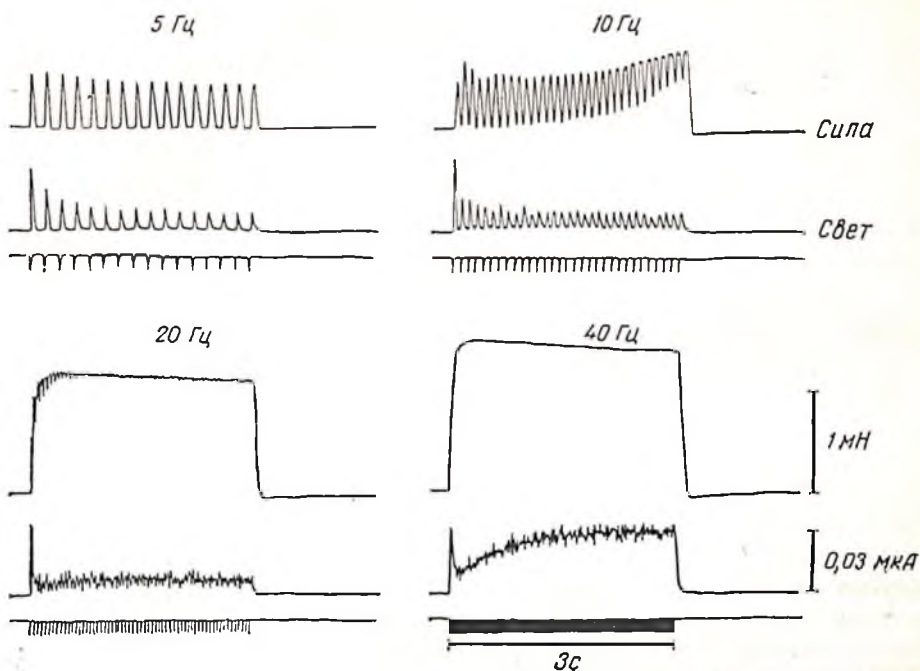


Рис. 10. Записи одиночных и тетанических сокращений волокон скелетной мышцы с введенным экворином. Изометрические сокращения волокна из мышцы *semitendinosus* лягушки *R. pipiens*. Инъекцию производили в одном участке волокна. Температура  $15^{\circ}\text{C}$ , длина саркомера 2,3 мкм. Пульсы с обозначенной частотой были произведены после длительных промежутков покоя.

### Сердечная мышца млекопитающих

Ввести достаточное количество экворина в отдельную мышечную клетку сердца для записи сигналов, подобных тем, которые показаны на рис. 9, не представляется возможным. Это связано отчасти с тем, что сердечные клетки слишком малы, и из-за того, что быстрые изменения уровня  $\text{Ca}$  имеют значительно меньшую амплитуду в сердечной мышце по сравнению со скелетной. Allen и Blinks [8] обнаружили, что для данного количества введенного экворина интенсивность световых сигналов из предсердия лягушки составляет лишь  $1/50$  от излучения скелетной мышцы того же вида животного. Достижимый при этом уровень представлен на рис. 7, однако его смысл не может быть однозначно понят по той же причине, что и в случае единичного сокращения скелетной мышцы. Мы обозначили его ввиду того, что потоки  $\text{Ca}$  в сердечной мышце гораздо более медленны, а это предполагает существование значительно менее крутых градиентов  $[\text{Ca}^{2+}]$ , чем при единичном сокращении скелетной мышцы. По этим причинам жела-

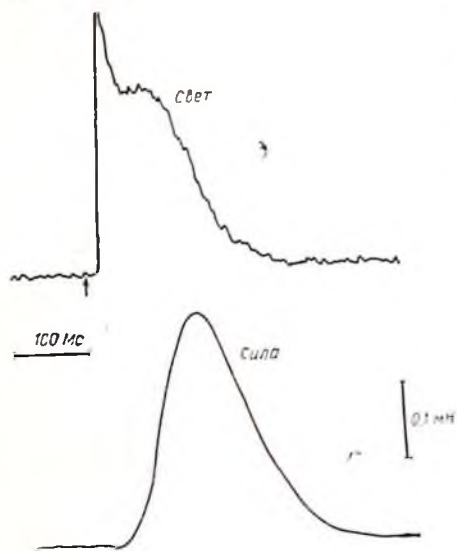


Рис. 11. Люминесцентный и механический ответы от волокна Пуркинье собаки. Эквирин в препарат вводили в нескольких участках: 512 последовательных изометрических сокращений были затем усреднены. Температура 35 °С, частота стимуляции — 1 раз в секунду. Стрелка обозначает момент возбуждения.

тельно производить инъекцию более чем в одну клетку, но даже в этом случае для получения удовлетворительного отношения сигнала к шуму необходимо усреднить серию последовательных сигналов. Этот подход, примененный в прошлом в опытах на предсердии сердца лягушки [8], используется нами в настоящее время и при работе с миокардом млекопитающего. Хотя запись сигналов возможна и от работающего миокарда, например папиллярной мышцы [13, 14], особенно удобными, как мы обнаружили, оказались волокна Пуркинье, поскольку большие размеры их клеток сокращают, как правило, количество необходимых инъекций от 50 до 10. Волокна Пуркинье обладают и другим полезным свойством, поскольку световые ответы от них часто имеют два различных компонента, которые гораздо труднее отличить в эквириновых сигналах от работающего миокарда. Эти компоненты ясно видны в верхней части рис. 11. Первая фаза эквиринового сигнала достигает своего пика в то время, когда напряжение только начинает расти. Пик второй фазы обычно очень близок по времени к моменту, когда скорость развития напряжения наибольшая. Амплитуда второго компонента эквиринового сигнала в волокне Пуркинье чрезвычайно подвержена изменениям и, когда они особенно выражены, первый компонент становится незаметным. Это проиллюстрировано на рис. 12, который показывает влияние частоты сокращений на эквириновый сигнал и развитие напряжения. При 100-секундных интервалах второй компонент настолько доминирует в световом сигнале, что затмевает первый. С уменьшением интервала между сокращениями вклад второго компонента уменьшается, а первого становится более видимым, а затем доминирующим. Мы установили, что близкие по времени парные пульсации являются особенно удобными для определения

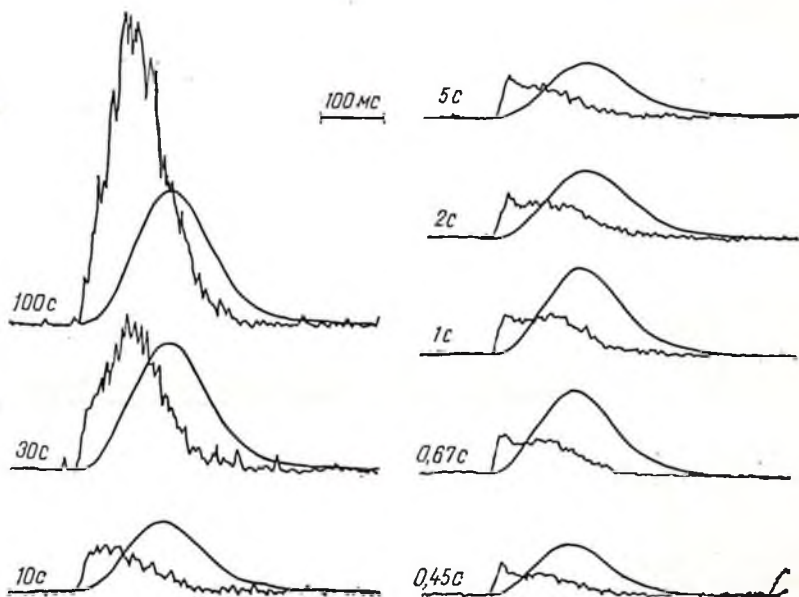


Рис. 12. Влияние частоты стимуляции на эквриновые сигналы и изометрические сокращения волокна Пуркинье собаки. Регистрацию сигналов при каждой частоте сокращения проводили по достижению стационарного состояния, интервалы между сокращениями (секунды) обозначены в левой части каждой записи. Сигналы были усреднены, число усредняемых сокращений менялось от 8 при двух меньших частотах до 128 при двух высших. Температура 35 °С.

влияния различных факторов на два компонента в эквриновом сигнале. Если выбрать определенным образом интервал между последовательными парами биений, можно ясно показать наличие двух компонентов. Если вторая пульсация следует сразу за первым, в его световом сигнале доминирующим окажется первый компонент (см. верхнюю часть рис. 13). В настоящее время мы проверяем гипотезу, что первый компонент отражает вход  $\text{Ca}$  в клетку, в то время как второй связан с высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из нее. Идея, что первый компонент отражает вход  $\text{Ca}$ , подкрепляется тем фактом, что его амплитуда меняется при изменении интервала между стимулом очень сходным образом с пиковой амплитудой медленного направленного внутрь кальциевого тока в опытах по фиксации потенциала на волокнах Пуркинье овцы [15].

Нижняя часть рис. 13 показывает, что как первый, так и второй компонент светового сигнала увеличиваются при концентрации кардиотонического стероида, оказывающей положительное инотропное действие. Это соответствует недавно полученным Weingart и соавт. [16] данным об усилении медленного направленного внутрь тока в волокнах Пуркинье теленка. Можно ожидать, что при возрастании входа  $\text{Ca}$  его хранилища будут запол-



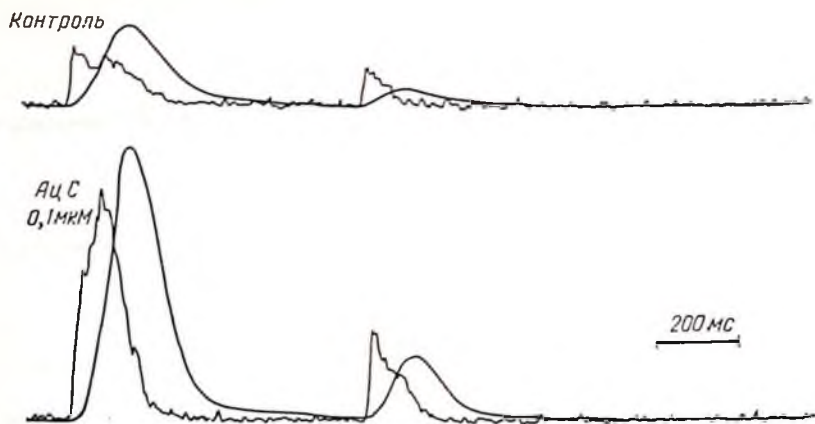


Рис. 13. Влияние ацетилстрофантидина на экваториальные сигналы и изометрические сокращения волокон Пуркинье собаки. Препарат стимулировали таким образом, чтобы получать сопряженные (750 мс) пары сокращений через каждый 5 с. 64 последовательные пары были усреднены для каждого набора кривых. Верхний набор был получен до, а нижний — после добавления  $10^{-7}$  М ацетилстрофантидина. Температура  $35^{\circ}\text{C}$ .

пены в большей степени, а освобождение этого иона будет увеличено. Катехоламины на волокнах Пуркинье также драматически увеличивают оба компонента экваториального сигнала (данные не приведены). Это согласуется с их хорошо установленной способностью увеличивать медленный направленный внутрь (кальциевый) ток в сердечной мышце [17].

Изменения в длине волокна резко контрастируют с тем, что обуславливаемым инотропным воздействием. Растяжение волокна Пуркинье до оптимальной длины вызывает лишь минимальные изменения в экваториальном сигнале (рис. 14). Единственным устойчивым изменением, которое мы обнаружили в экспериментах такого рода при растяжении мышцы, является небольшое заужение сигнала. Сходное наблюдение было сделано Allen и Kurihara [13] на папиллярной мышце кошки. Результаты этих опытов на мышце сердца млекопитающих поразительно отличаются от предыдущих данных, полученных на мышце предсердия лягушки [8], согласно которым амплитуда экваториального сигнала значительно снижалась при растяжении препарата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экворил, введенный в клетку посредством микроинъекции, может помочь обнаружить изменения внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Перевод экваториального сигнала в абсолютную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  осуществляется косвенно и зависит от определенных допущений в составе внутриклеточной жидкости. Наилучшая наша оценка  $[\text{Ca}^{2+}]$  в скелетной мышце в состоянии покоя со-

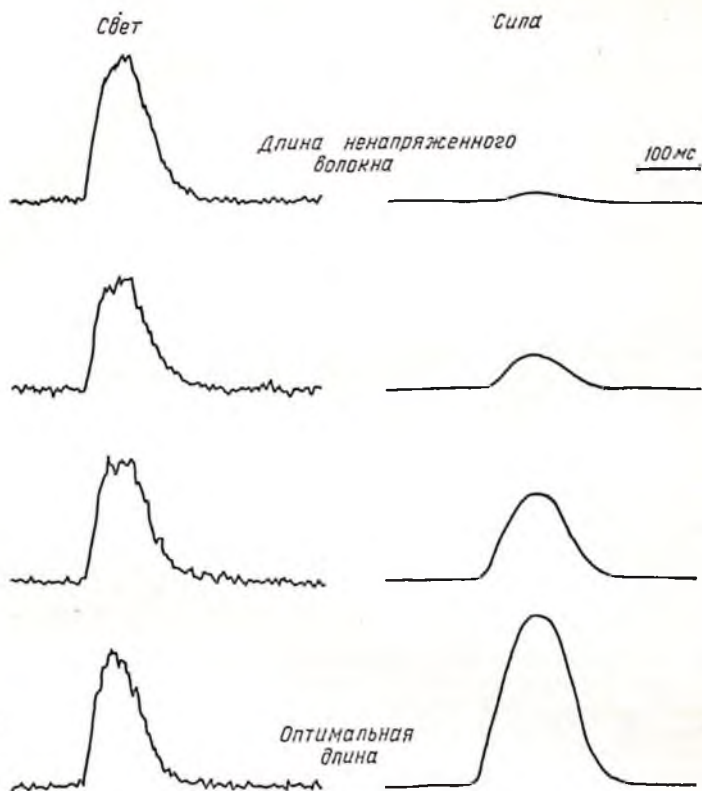


Рис. 14. Влияние длины волокна на экворпный сигнал и изометрические сокращения тяжа Пуркинье. Представлены ответы, записанные от четырех волокон различной длины, соответствующей ненапряженному состоянию (верхняя часть) и все более растянутому состоянию вплоть до развития максимального напряжения (нижняя часть). Интервал между стимулами 2,5 с, температура 35 °С, было усреднено 128 сокращений.

ставляет  $8 \cdot 10^{-8}$  М; во время тетануса концентрация увеличивается примерно до  $10^{-5}$  М. Оценки абсолютной  $[Ca^{2+}]$  при одиночных сокращениях неопределенны из-за возможного существования градиентов  $[Ca^{2+}]$  в клетке. Однако амплитуда экворпного сигнала при одиночных сокращениях скелетной мышцы является, возможно, хорошим индикатором количества Са, высвободившегося из внутриклеточных резервуаров.

Изменения уровня Са имеют меньшую амплитуду в сердечной мышце, чем в скелетной. В экворпных сигналах от волокон Пуркинье собаки есть два легко различаемых компонента, которые, возможно, соответствуют входу Са и выделению. Второй компонент (выделение) гораздо более чувствителен к инотропным воздействиям, чем первый; ни один из них не меняется в значительной степени при изменениях длины волокна.

## СИНОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. *Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y.* Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.—*J. cell. Comp. Physiol.*, 1962, 59:59, 223—239.
2. *Prendergast F. G., Mann K. G.* Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*.—*Biochemistry*, 1978, 17, 3448—3453.
3. *Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y.* Microdetermination of calcium by aequorin luminescence.—*Science*, 1963, 140, 1339—1340.
4. *Blinks J. R.* Applications of calcium-sensitive photoproteins in experimental biology.—*Photochem. Photobiol.*, 1978, 27, 423—432.
5. *Blinks J. R., Mattingly P. H., Jewell B. R., et al.* Practical aspects of the use of aequorin as a calcium indicator: Assay, preparation, microinjection and interpretation of signals.—*Methods Enzymol.*, 1979, 57, 292—328.
6. *Blinks J. R., Prendergast F. G., Allen D. G.* Photoproteins as biological calcium indicators.—*Pharmacol. Rev.*, 1976, 28, 1—93.
7. *Blinks J. R., Rüdell R., Taylor S. R.* Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: Detection with aequorin.—*J. Physiol.*, 1978, 277, 291—323.
8. *Allen D. G., Blinks J. R.* Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle.—*Nature*, 1978, 273, 509—513.
9. *Allen D. G., Blinks J. R.* The interpretation of light signals from aequorin-injected skeletal and cardiac muscle cells—a new method of calibration.—In: *Detection and Measurement of Free Calcium in Cells/Eds. C. C. Ashley, A. K. Campbell.* Elsevier North Holland, Amsterdam. In press, 1979.
10. *Allen D. G., Blinks J. R., Prendergast F. G.* Aequorin luminescence: Relation of light emission to calcium concentration.—A calcium-independent component.—*Science*, 1977, 196, 996—998.
11. *Hastings J. W., Mitchell G., Mattingly P. H., Blinks J. R., van Leeuwen M.* Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration.—*Nature*, 1969, 222, 1047—1050.
12. *Fabiato A., Fabiato F.* Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.—*J. Physiol.*, 1978, 276, 233—255.
13. *Allen D. G., Kurihara S.* Calcium transients at different muscle lengths in rat ventricular muscle.—*J. Physiol.*, In press, 1979.
14. *Wier W. G.* Intracellular calcium transients accompanying contraction of mammalian cardiac muscle.—*Fed. Proc.*, 1979, 38, 1389.
15. *Gibbons W. R., Fozzard H. A.* Slow inward current and contraction of sheep cardiac Purkinje fibers.—*J. gen. Physiol.*, 1975, 65, 367—384.
16. *Weingart R., Kass R. S., Tsien R. W.* Is digitalis inotropy associated with enhanced slow inward calcium current?—*Nature*, 1978, 273, 389—392.
17. *Reuter H.* Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium.—*Circulat. Res.*, 1974, 34, 599—605.

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КАЛЬЦИЙТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СЕРДЦА

Д. О. ЛЕВИЦКИЙ, Д. С. БЕНЕВОЛЕНСКИЙ, Т. С. ЛЕВЧЕНКО (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно расчетам, выполненным в ряде лабораторий [1—6], для обеспечения нормального расслабления сердца кальциевый насос, сосредоточенный в 1 г мышцы, должен удалять Са из миоплазмы со скоростью 60—150 нмоль за 200 мс. Предполагается, что в сердцах теплокровных, как и в «быстрых» скелетных мышцах, основной вклад в процессе аккумуляции Са при расслаблении вносит мембранная сеть саркоплазматического ретикулума [7—8]. В то же время имеются свидетельства, что изолированные митохондрии, концентрация которых в сердце велика, также способны при определенных условиях накапливать значительные количества ионов Са [2, 9]. Участие митохондрий в расслаблении сердечной мышцы осаривается в связи с тем, что система кальциевого транспорта митохондрий имеет значительно более низкое сродство к Са по сравнению с кальцийпоглощающей системой саркоплазматического ретикулума [10]. Сравнительная оценка систем кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума и митохондрий затруднена в связи с низким выходом ретикулярной фракции из сердца и повышенной лабильностью изолированных препаратов сердечных микросом. Определить кальцийтранспортирующую способность сердечного саркоплазматического ретикулума можно в результате полного извлечения из сердца ретикулярных мембран при условии сохранения активности системы кальциевого насоса в процессе выделения. В данной работе произведена оценка скорости поглощения Са суммарной фракцией саркоплазматического ретикулума, выделенного из сердца, и определено количество саркоплазматического ретикулума, сосредоточенного в 1 г сердечной мышцы.

### МЕТОДЫ

Выделение микросом из сердец голубя и морской свинки осуществляли двумя способами. 1. Сердце промывали в дистиллированной воде и ледяной среде выделения, содержащей 30% глицерин, 10 мМ имидазол (рН 7,2), 1 мМ дитиотрейтол, 5 мМ азид натрия, освобождали от жира и крупных сосудов и после взвешивания измельчали в гомогенизаторе «Virtis-45». Гомогенизацию 5—20 г сердечных мышц проводили при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  в стеклянных стаканах емкостью 30 или 100 мл. Режим гомогенизации — 13 500 об/мин, 15 с и 22 500 об/мин, 10—15 с. Гомогенат

центрифугировали 20 мин при 10 800 g. Осадок помещали в ледяную среду выделения, гомогенизировали 10—15 с при 22 500 об/мин и гомогенат вновь подвергали низкоскоростному центрифугированию. Для экстракции актомиозина полученные супернатанты разбавляли равным объемом 1,2 М KCl. Фракцию мембран микросом осаждали при 115 000 g в течение 40—60 мин. Полученные осадки, содержащие микросомальные мембраны, суспендировали в 0,05 М KCl, 20 мМ трис-малеатном буфере (pH 6,8). Для полного извлечения кальцийтранспортирующих мембран одну и ту же навеску ткани гомогенизировали 10—12 раз, при этом получали 10—12 порций микросомальных фрагментов.

2. Второй способ получения микросом включал элементы метода, предложенного Harigaya и Schwartz [2]. 17 г сердечных мышц после промывания в 0,9% NaCl помещали в 68 мл среды, содержащей 10 мМ бикарбоната натрия и 5 мМ азид натрия (pH 7,0), 0 °С. Ткань последовательно гомогенизировали с помощью гомогенизаторов «Virtis-45» при режиме 13 500 об/мин, 10 с и «Polytron» PCU-2-110 (генератор PT-10), 3 раза по 5 с с интервалами в 20 с. Обломки клеток, миофибриллы и митохондрии осаждали при 8000 g в течение 20 мин. Осадок вновь подвергали последовательно гомогенизации с помощью «Polytron» в прежнем режиме и низкоскоростному центрифугированию. Фракции микросом выделяли из надосадочной жидкости способом, описанным выше.

При выделении митохондриальной фракции гомогенат, полученный с помощью «Polytron» (см. способ 2), центрифугировали при 310 g в течение 10 мин. К надосадочной жидкости добавляли равный объем раствора, содержащего 1,2 М KCl 20 мМ трис-малеатный буфер (pH 6,8). Митохондрии осаждали при 5000 g в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 50 мМ KCl 20 мМ трис-малеатном буфере (pH 6,8).

Очищенную фракцию саркоплазматического ретикулума сердца морской свинки получали по методу, предложенному ранее [11].

Фосфорилирование Ca<sup>2+</sup>-зависимости АТФ-азы осуществляли при 0 °С в 1 мл среды, содержащей 0,1 М KCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7,1), 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 20 мкМ [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ. Реакцию инициировали добавлением 0,5—1 мг белка микросом и через 15 с останавливали добавлением 5 мл ледяного раствора, содержащего 6% трихлоруксусную кислоту, 0,5 мМ АТФ, 1 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования при 1000 g в течение 15 мин, удаляли с помощью водоструйного насоса. Осадок промывали дважды 15 мл 6% трихлоруксусной кислоты и 1 раз 15 мл 10% сахарозы. Большую часть осадка растворяли при 90 °С в 1 мл 2 М NaOH, после чего в пробах определяли концентрацию белка и уровень радиоактивности. Часть осадка и подвергали электрофорезу в полиакриламидных гелях [11].

Уровень фосфорилированного белка был измерен также с использованием метода фильтрования. При таком способе к 0,5 мл реакционной среды добавляли 0,07—0,25 мг белка микросом. Реакцию останавливали равным объемом раствора, содержащего 20% трихлоруксусную кислоту, 1 мМ АТФ, 2 мМ  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . 0,5 мл аликваты суспензии денатурированного белка фильтровали под вакуумом через фильтр «Whatman» GF/C. Адсорбированные на фильтре мембраны промывали 6 раз 3 мл 6% трихлоруксусной кислоты. В контрольных пробах [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-АТФ вносили после остановки реакции раствором, содержащим трихлоруксусную кислоту. Включение радиоактивной метки в фильтры измеряли в сцинтилляционном спектрометре Mark-III. Среда инкубации для фосфорилирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы содержала 100 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7,1), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ ЭГТА.

Поглощение кальция в присутствии оксалата калия было измерено с помощью pH-метрического метода [11]. Среда инкубации включала 0,1 М KCl, 5 мМ АТФ, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 6 мМ азид натрия, 6,5 мМ оксалат калия, 10 мМ трис-HCl буфер (pH 6,9), 0,1—0,5 мг белка микросом. Реакцию инициировали добавлением 25 мкМ  $\text{CaCl}_2$ . Уровень  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы и скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  определяли, как указано ранее [11]. Скорость поглощения кальция без оксалата, или АТФ-зависимое «связывание» кальция микросомами была определена методом быстрой остановки реакции [6] с использованием  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . В 0,5 мл среды инкубации, включающей 0,1 М KCl, 6 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 4 мМ азид натрия, 20 мМ имидазол (pH 7,0) и 22 мкМ  $^{45}\text{CaCl}_2$  (около 600 000 имп/мл · мл) вносили 0,1 мг микросомального белка и инкубировали в водяной бане при 22 или 37°C в течение 1 мин. После этого в постоянно перемешиваемый на магнитной мешалке раствор впрыскивали 20 мкл 25 мМ АТФ (pH 7,0). Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в пробе после добавления АТФ составляла 24 мкМ. Через определенный промежуток времени реакцию останавливали добавлением 0,5 мл раствора 50 мМ ЭГТА, 0,1 М KCl, 40 мМ гистидина (pH 6,0). Реакционную смесь через 15—30 с фильтровали через 0,45-микрометровый фильтр «Millipore». Фильтр промывали 5 мл раствора, содержащего 1 мМ ЭГТА, 0,1 М KCl, 10 мМ гистидина (pH 6,0), высушивали и помещали в толуольный сцинтиллятор. Количество связывающегося с фильтром радиоактивного кальция определяли в сцинтилляционном спектрометре «Mark-III». Концентрацию белка определяли модифицированным методом Lowry [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Полное извлечение системы кальциевого насоса из сердечной мышцы

В предварительных экспериментах было установлено, что способность изолированных микросомальных мембран сердца к поглощению Ca значительно снижается при увеличении интенсив-

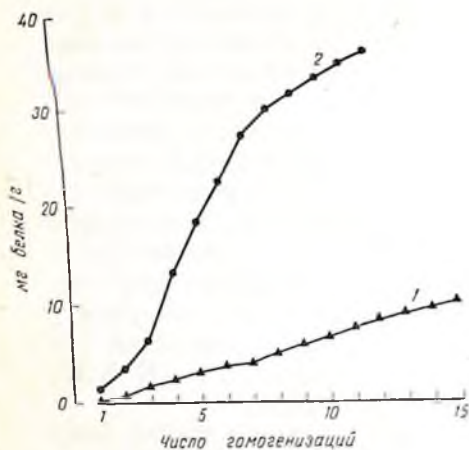


Рис. 15. Накопление белка в микросомальной фракции при многократной гомогенизации сердечной мышцы.

Кривая 1—17 г сердечной мышцы морской свинки гомогенизировали, как описано в разделе «Методы», используя гомогенизатор «Polytron», кривая 2 — 20 г сердце голубей гомогенизировали с помощью «Virtis» — 45.

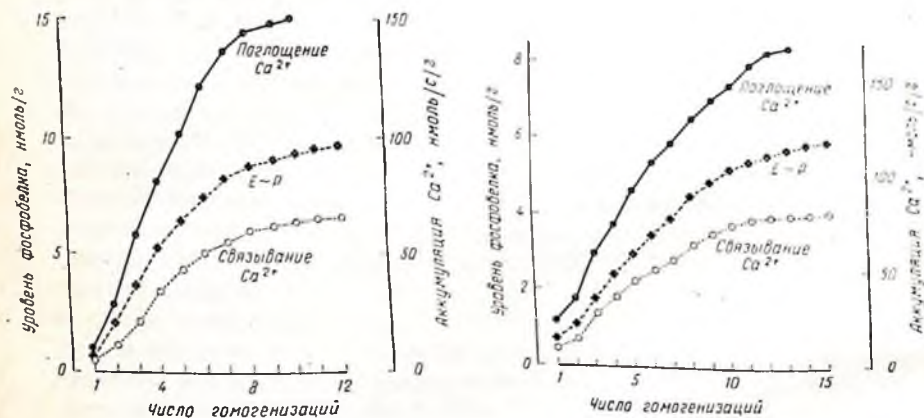
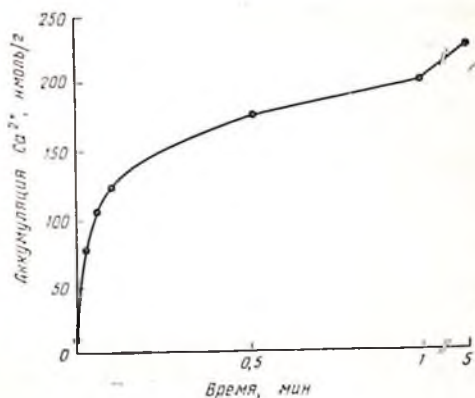


Рис. 16. Выход во фракцию микросом кальцийтранспортирующих и фосфорилирующихся везикул при многократной гомогенизации сердечной мышцы.

а — сердце голубя; б — сердце морской свинки. Каждая точка на кривой соответствует сумме значений, определенных в данной и предыдущих фракциях. Поглощение кальция в присутствии оксалата и «связывание» кальция без оксалата измеряли как описано в разделе «Методы».

ности гомогенизации мышцы. Очевидно, что в этом случае везикулы, извлеченные из клеток, подвергаются дальнейшему измельчению, что сопровождается увеличением проницаемости мембран для ионов  $Ca$ . В связи с этим мы предпочли мягкую гомогенизацию в течение коротких промежутков времени. После центрифугирования гомогената при 800—10800 г микросомальную фракцию, сосредоточенную в супернатанте, осаждали высокоскоростным центрифугированием, а осадок вновь подвергали гомогенизации и дифференциального центрифугирования. Суммарная кальций-

Рис. 17. Аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$  суммарной фракцией микросом сердца голубя. Суммарный препарат получен объединением всех микросомальных фракций, изолированных в результате многократной гомогенизации навески сердечной мышцы.



транспортирующая способность микросом, извлеченных таким способом, оказалась существенно выше, чем при непрерывной и интенсивной гомогенизации сердечной мышцы.

С каждым циклом выделения с фракцией микросом осаждается дополнительное количество белка (рис. 15). При использовании гомогенизатора «Polytron» (кривая 1) во фракцию микросом выходит примерно в 3 раза меньше белка, чем при измельчении мышцы гомогенизатором «Virtis-45» (кривая 2).

На рис. 16 приведены данные о накоплении в микросомальной фракции мембран, способных аккумулировать  $\text{Ca}$  и образовывать фосфорилированный продукт в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  и высокой концентрации ионов  $\text{Ca}$ . При многократной гомогенизации сердец голубей (рис. 16, а) и морских свинок (рис. 16, б) наблюдаются в конечном счете снижение и практическое прекращение выхода активных мембран в микросомальную фракцию. В то же время значительное накопление белка происходит даже на последних циклах выделения кальцийтранспортирующей системы (см. рис. 15).

Выделенные из 1 г сердца голубя и морской свинки мембраны в отсутствие кальцийпреципитирующих анионов способны поглощать при  $37^\circ\text{C}$  соответственно 66 и 79 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  в 1 с (см. рис. 16, а, б). При включении в инкубационную среду 5 мМ оксалата скорость аккумуляции  $\text{Ca}$  оказалась вдвое выше: 151 и 167 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  в 1 с (см. рис. 16, а, б). Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы в этих же процентах составляла 152 и 140 нмоль  $\text{P}_i$  в 1 с на 1 г сырой массы.

Оксалат, проикая через мембраны саркоплазматического ретикулаума, понижает концентрацию  $\text{Ca}$  внутри везикул и обеспечивает тем самым линейную скорость его транспорта [13]. Сходство кривых, приведенных на рис. 16, указывает, что в начальные моменты времени аккумуляции без оксалата  $\text{Ca}$  еще не оказывает значительного ингибирующего действия на систему собственного транспорта. В то же время, как видно из рис. 17, кривая поглощения  $\text{Ca}$  во времени в отсутствие оксалата



имеет нелинейный характер, что предполагает прогрессирующее увеличение ингибирующего эффекта внутривезикулярным  $\text{Ca}$  и (или) увеличение обратной диффузии этого катиона в инкубационную среду. Из этого следует, что постоянная скорость накопления  $\text{Ca}$  в присутствии оксалата адекватно отражает начальную скорость его транспорта, измеренную в более физиологических условиях.

### Природа извлеченной кальцийтранспортирующей системы

Суммарная фракция мембран, выделенная из 1 г сердца голубя, способна при 24 мкМ концентрации свободных ионов  $\text{Ca}$  связывать свыше 200 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  (см. рис. 17), что сопоставимо со значением, полученным Solaro и Briggs для сердца собаки [14]. Этой величины более чем достаточно для обеспечения поглощения  $\text{Ca}$ , локализованного в миоплазме и связанного с сократительным аппаратом сердца, находящимся в состоянии систолы [2—6].

Какая структура ответственна за аккумуляцию  $\text{Ca}$  в выделенных нами препаратах? Помимо мембран саркоплазматического ретикулума, к энергозависимому связыванию  $\text{Ca}$  способны миофибриллы, митохондрии и участки сарколеммальной мембраны [2, 9, 10, 15]. Возможность участия миофибрилл в связывании  $\text{Ca}$  в условиях наших опытов была исключена на основании результатов эксперимента с антибиотиком А23187. Как видно из табл. 1, этот антибиотик, являющийся переносчиком  $\text{Ca}$  через модельные и природные мембраны [16], полностью блокирует аккумуляцию его выделенными из сердец морских свинок препаратами. Из этого можно заключить, что кальцийаккумулирующая система в данном случае имеет мембранную и везикулярную структуру. Табл. 1 содержит также данные о поглощении  $\text{Ca}$  митохондриями, выделенными в той же гипотонической среде, что и микросомальная фракция. Как следует из табл. 1, аккумуляция  $\text{Ca}$  митохондриями в азидсодержащей среде весьма незначительна. Это поглощение обусловлено скорее всего примесью микросомальных мембран.

Для того чтобы оценить степень участия фрагментов сарколеммы в поглощении  $\text{Ca}$  изолированными нами везикулами, мы измерили стационарный уровень фосфорилированных мембранных белков в тех условиях [17, 18], которые являются оптимальными для образования фосфобелковых интермедиатов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой и натрий-калиевой АТФ-азы (табл. 2). В присутствии ионов  $\text{Ca}$  происходит фосфорилирование любого из препаратов, полученного в различных стадиях «экстракции» кальцийтранспортирующих мембран. При этом наблюдается соответствие между уровнем фосфобелка и скоростью аккумуляции  $\text{Ca}$ . В то же время уровень фосфобелка  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы не коррелирует с кальцийаккумулирующей способностью везикул. Это свидетельствует в пользу того,

ТАБЛИЦА 1

ПОГЛОЩЕНИЕ  $\text{Ca}^{2+}$  ПРЕПАРАТАМИ МИТОХОНДРИИ И МИКРОСОМ,  
ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ СЕРДЕЦ МОРСКИХ СВИНОК

Препарат	Поглощение $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/с на 1 мг белка
Митохондрии	0,46*
Микросомы	7,46*
CP <sub>3</sub>	12,03
CP <sub>3</sub> +10 мкМ А23187	0,09
CP <sub>12</sub>	1,25
CP <sub>12</sub> +10 мкМ А23187	0,02

Митохондрии и микросомы выделяли, как описано в разделе «Методы», с помощью гомогенизатора «Polytron» в среде, предложенной Harigaya и Schwartz [4]. Состав среды для определения аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в отсутствие оксалата представлен в разделе «Методы». Температура инкубационной среды 37° или 22° С (отмечено звездочкой). Антибиотик А23187 был любезно предоставлен компанией Eli-Lilly (США). CP<sub>3</sub> и CP<sub>12</sub> обозначают препараты саркоплазматического ретикулула, полученные после 3-й и 12-гомогенизации навески сердечной мышцы.

ТАБЛИЦА 2

СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ Са МИКРОСОМАМИ ИЗ СЕРДЦА МОРСКОЙ СВИНКИ  
И ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ, ОПТИМАЛЬНЫХ ДЛЯ  
ОБРАЗОВАНИЯ ФОСФОНЗИМА  $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ  
АТФ-АЗОИ И  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-АЗОИ

Препарат	Поглощение $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/с на 1 мг белка		Фосфорилирование, нмоль P <sub>i</sub> /мг белка		
	-оксалат	+оксалат	+Ca <sup>2+</sup>	+Na <sup>+</sup> +ЭГТА	+ЭГТА
CP <sub>1</sub>	24,9	63,7	1,93	0,31	0,10
CP <sub>4</sub>	12,2	22,0	0,84	0,19	0,07
CP <sub>9</sub>	4,8	14,0	0,29	0,10	0,06
CP <sub>14</sub>	1,5		0,19	0,08	0,02
$\text{Ca}^{2+}$ -оксалатный препарат			2,80	0,07	0,07

Состав инкубационных сред представлен в разделе «Методы». Из среды, содержащей 2 мМ ЭГТА, был исключен  $\text{CaCl}_2$ ; CP<sub>1</sub>-CP<sub>14</sub> обозначают препараты микросомальных мембран, полученные после соответствующих циклов гомогенизации и центрифугирования навески сердечной мышцы. Очищенная система кальцевого насоса саркоплазматического ретикулула ( $\text{Ca}^{2+}$ -оксалатный препарат) была получена в соответствии с методом, изложенным ранее [11].

что фрагменты сарколеммы не вносят существенного вклада в связывание Са выделенными нами препаратами.

Таким образом, можно сделать вывод, что именно везикулы саркоплазматического ретикулула являются основной, если не единственной структурой, аккумулирующей Са в условиях наших опытов.

## Определение количества саркоплазматического ретикулума в сердцах голубя и морской свинки

До сих пор нет единого мнения о концентрации мембран саркоплазматического ретикулума в сердцах теплокровных. Эту величину можно установить, сопоставляя количество молекул  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы в очищенном и полностью извлеченном из мышцы препарате саркоплазматического ретикулума. Количество молекул  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы определяется по стационарному уровню фосфорилированного белкового интермедита, образующегося в одной из стадий АТФ-азной реакции [17, 19]. Очищенная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФ-аза саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы включает около 10  $\mu\text{моль P}_i$  на 1 мг белка, что предполагает существование одной ацилфосфатной связи в молекуле этого фермента, имеющего молекулярную массу 100 000 [20].

Для выяснения природы компонента, фосфорилирующегося в выделенных нами препаратах микросом, было выполнено их разделение электрофорезом в SDS-полиакриламидных гелях при pH 2,4. В подобных кислых условиях происходит стабилизация ацилфосфатной связи [21]. На рис. 18 показано распределение радиоактивного фосфата в кусочках гелей, содержащих разделенные по молекулярной массе белки двух препаратов микросом сердца голубя. Основное включение метки наблюдается в высокомолекулярный компонент, проявляемый в присутствии красителя Кумасси и имеющий молекулярную массу 100 000. Небольшое включение радиоактивного фосфата в другой участок геля приходится на белок с молекулярной массой около 200 000, соответствующий, по-видимому, димеру основного фосфатного акцептора. Таким образом, единственным белком, принимающим кощевой фосфат от молекулы АТФ в условиях наших экспериментов, является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФ-аза саркоплазматического ретикулума. Накопление фосфорилированного продукта во фракции микросом, извлекаемой при последовательных циклах гомогенизации и дифференциального центрифугирования (см. рис. 16), отражает выход в суммарную микросомальную фракцию кальций-зависимой ретикулярной АТФ-азы.

Мы установили, что высокоочищенные мембраны саркоплазматического ретикулума сердца голубя связывают 2,5  $\mu\text{моль P}_i$  на 1 мг белка [11]. Это значение для препарата, очищенного из микросом сердца морской свинки, составляет 2,8  $\mu\text{моль P}_i$  мг. Очищенные препараты мембран были получены в ходе процедуры, включающей осаждение активных везикул, частично загруженных оксалатом кальция, и по ряду свойств близки относительно просто устроенному изолированному скелетному саркоплазматическому ретикулуму [11]. Одним из подтверждений высокой степени чистоты «кальций-оксалатного препарата» сердечных микросом является отсутствие включения в него кощевого фос-

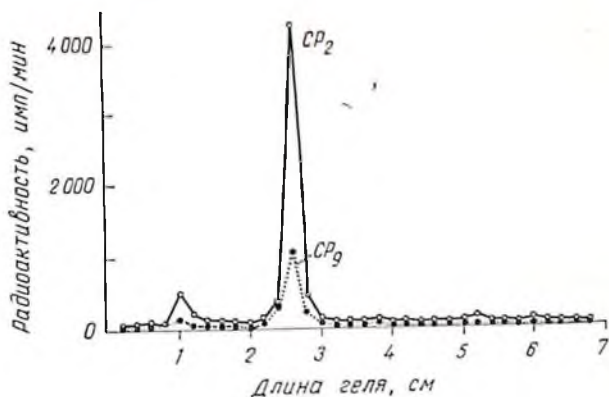


Рис. 18. Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле фосфорилированных микросом сердца морской свишки.

Условия инкубации мембран с  $[\gamma\text{-}^3\text{P}]\text{ATP}$  и электрофоретического разделения белков при pH 2,4 изложены в разделе «Методы» и в опубликованной ранее работе [11].

фата молекулы АТФ в условиях, оптимальных для фосфорилирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы (см. табл. 2).

Из сопоставления уровня  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы в очищенном (2,5 и 2,8 нмоль на 1 мг белка) и полностью извлеченном, но не подвергнутом очистке (9,7 и 5,9 нмоль/г сердца) саркоплазматическом ретикулуме следует, что в 1 г сердца голубя и морской свишки содержится соответственно 3,9 и 2,1 мг ретикулярного белка. Количество саркоплазматического ретикулума можно оценить, также сопоставляя активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы в очищенном и полностью экстрагированном из мышц препаратах саркоплазматического ретикулума. Для микросом из сердца голубя эти значения составляют 2,6 мкмоль  $\text{P}_i$  в 1 мин на 1 мг белка [11] и 9,15 мкмоль  $\text{P}_i$  в 1 мин на 1 г сердца. При такой оценке на 1 г сердца голубя приходится 3,5 мг белка саркоплазматического ретикулума.

Принимая во внимание молекулярную массу  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы (100 000), уровень фосфорилированного продукта в очищенном ферменте (10 нмоль на 1 мг белка) и данные о фосфорилировании полностью извлеченного из сердец голубя и морской свишки саркоплазматического ретикулума (2,5 и 2,8 нмоль на 1 г мышцы соответственно), можно заключить, что в 1 г сердец содержится от 0,5 до 1 мг белка  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая лабильность и низкий выход саркоплазматического ретикулума из гомогената сердечной мышцы препятствуют изучению роли ретикулярных мембран в расслаблении миокарда. Дискутируется вопрос о вкладе саркоплазматического ретикулума в аккумуляцию  $\text{Ca}$  при расслаблении сердца [2, 4, 6, 7, 8, 10, 14].

Расчеты кальцийтранспортирующей способности саркоплазматического ретикулула, локализованного в 1 г мышцы сердца, основываются на следующих постулатах и допущениях: 1) для максимальной активации миофибрилл сократительный аппарат должен связывать 60—150 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  на 1 г сердца [2—6]; 2) время от достижения сердцем максимального сокращения до наступления полного расслабления, т. е. период, в течение которого весь Са, связанный с тропонином, должен быть поглощен системой кальциевого насоса, составляет 200 мс [1]; 3) количество белка саркоплазматического ретикулула в сердце теплокровных составляет 1—5 мг на 1 г мышцы [2, 10]. Кальцийтранспортирующая активность изолированных из сердца микросом находится в диапазоне 5—130 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  в 1 с, на 1 мг белка [2, 6, 10, 22, 23].

Исходя из полученного Schwartz и соавт. [22] значения скорости поглощения Са изолированными микросомальными везикулами (130 нмоль в 1 с на 1 мг белка) и верхнего предела для концентрации белка саркоплазматического ретикулула в сердце [10] следует, что ретикулярная сеть сердца способна связывать за 200 мс до 130 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  на 1 г мышцы, т. е. полностью обеспечивает расслабление. При этом приходится постулировать, что активность всего саркоплазматического ретикулула, сосредоточенного в сердце, не ниже активности небольшой фракции изолированных микросомальных мембран [22]. Естественно, что результаты подобных расчетов не могут служить аргументом при рассмотрении роли саркоплазматического ретикулула в расслаблении сердца до тех пор, пока не будет установлен уровень саркоплазматического ретикулула в мышце.

Первая оценка количества саркоплазматического ретикулула, извлеченного из сердца стандартным методом, была дана в работе Solaro и Briggs [14]. Эти авторы сопоставили кальцийаккумулирующую способность гомогената сердца и изолированных фрагментов саркоплазматического ретикулула. Им было показано, что в 1 г сердца собаки содержится 6,8 мг белка ретикулярного происхождения. Will и соавт. [6], используя это значение, рассчитали, что при 19 мкМ концентрации свободных ионов кальция саркоплазматический ретикулум, выделенный из 1 г сердца собаки, способен при 37°C поглощать 48 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  за 200 мс. Эта величина является, по-видимому, завышенной, поскольку препарат саркоплазматического ретикулула, полученный Solaro и Briggs при интенсиальной гомогенизации ткани «Sorvall Omnimixer», не был подвергнут дальнейшей очистке [4, 14].

В данной работе для оценки кальцийтранспортирующей способности саркоплазматического ретикулула был использован принципиально иной подход. Маркером системы кальциевого насоса саркоплазматического ретикулула был выбран фосфорилированный интермедиат  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы, стабильный при низких значениях рН. Концентрация фосфоэнзима, по нашему

меньше, лучше отражает уровень саркоплазматического ретикулула по сравнению с такими параметрами, как скорость аккумуляции кальция в присутствии оксалата и кальций-оксалатная емкость. Скорость и максимальный уровень аккумуляции Са фрагментами саркоплазматического ретикулула зависят от степени интактности ретикулярной мембраны. В связи с этим можно предположить, что поглощение Са в гомогенате сердца, содержащем участки неразрушенной сети саркоплазматического ретикулула, и в изолированных микросомальных фрагментах происходит с различной эффективностью. С другой стороны, разрушение мембран детергентом [20] или удаление основной массы мембранных липидов [24] практически не влияет на величину фосфорилирования Са<sup>2+</sup>-зависимой АТФ-азы.

В препаратах микросом, извлеченных из сердца, единственным фосфорилирующимся компонентом является белок с молекулярной массой 100 000 (см. рис. 18). Включение радиоактивного фосфата в препараты не наблюдалось при связывании кальция ЭГТА (см. табл. 2). Таким образом, акцептором фосфата в препаратах мембран в условиях наших опытов является молекула Са<sup>2+</sup>-зависимой АТФ-азы. Поэтому фосфоэнизм, образованный в присутствии ионов кальция, можно считать специфическим маркером саркоплазматического ретикулула. Кроме того, уровень фосфобелка может служить надежным критерием чистоты препарата.

Для оценки количества саркоплазматического ретикулула в 1 г сердца мы провели сравнение уровней фосфорилированного интермедната Са<sup>2+</sup>-зависимой АТФ-азы в суммарной фракции микросом с уровнем фосфоэнизма в высокоочищенном препарате системы кальциевого насоса. Было установлено, что в 1 г сердца сосредоточено от 2 до 4 мг белка саркоплазматического ретикулула.

Колебания уровня фосфоэнизма в препаратах соответствуют изменениям кальцийтранспортирующей способности (см. рис. 15, 16, табл. 2) и активности Са<sup>2+</sup>-зависимой АТФ-азы (данные не приведены). Это свидетельствует о том, что в мягких условиях гомогенизации, использованных нами, не происходит существенного увеличения проницаемости мембран для накапливаемого внутри везикул Са даже в тех препаратах, которые получены в последних стадиях экстракции. Отсюда был сделан вывод, что в процессе длительного выделения активность кальцийтранспортирующей системы не снижается. По всей видимости, данные, приведенные на рис. 16, могут реально отражать активность системы кальциевого насоса в целом сердце.

На основании полученных результатов скорость поглощения Са саркоплазматическим ретикулулом при 24 мкМ Са<sup>2+</sup> может достигать 16 пмоль за 200 мс на 1 г мышцы. Мы останавливали реакцию аккумуляции Са микросомами через 1 с после ее иницирования добавкой АТФ. Однако, как видно из рис. 17, ско-

рость аккумуляции Са пелипейна, что подтверждает данные, полученные ранее с помощью аналогичного метода [6] и спектрофотометрической техники с использованием индикатора кальциевых ионов мурексида [2]. Согласно данным Will и соавт. [6], количество  $\text{Ca}^{2+}$ , поглощенного микросомами при 22°C за 200 мс, составляет 50—70% от уровня, измеренного через 1 с. Если соотношение скоростей аккумуляции Са при 22° и 37°C остается постоянным во временном промежутке от 0,2 до 1 с, то препараты, выделенные нами из 1 г мышцы, способны аккумулировать до 60—100 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  за 200 мс. Это соответствует скорости, необходимой для того, чтобы во время расслабления удалить весь Са из миоплазмы и максимально проактивированных миофибрилл [2—6].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer G. A. Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.—*Physiol. Rev.*, 1968, 48, 708—757.
2. Harigaya S., Schwartz A. Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle.—*Circulat. Res.*, 1969, 25, 781—794.
3. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I. Control of muscle contraction.—*Quart. Rev. Biophys.*, 1969, 2, 351—384.
4. Katz A. M. Contractile proteins of the heart.—*Physiol. Rev.*, 1970, 50, 63—158.
5. Solaro R. J., Wise R. M., Shiner J. S., Briggs F. N. Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation.—*Circulat. Res.*, 1974, 34, 525—530.
6. Will H., Blanck J., Smettan G., Wollenberger A. A quench-flow kinetic investigation of calcium ion accumulation by isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. Dependence of initial velocity on free calcium ion concentration and influence of preincubation with a protein kinase, MgATP and cyclic AMP.—*Biochim. biophys. Acta*, 1976, 449, 295—303.
7. Katz A. M., Repke D. J. Quantitative aspects of dog cardiac microsomal calcium binding and calcium uptake.—*Circulat. Res.*, 1967, 21, 153—165.
8. Ebashi S., Endo M. Calcium ion and muscle contraction.—In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology/* Eds. J. A. V. Butler, D. Noble. New York: Pergamon Press, 1968, p. 123.
9. Patriarca P., Carafoli E. Study of the intracellular transport of calcium in rat heart.—*J. cell. Physiol.*, 1968, 72, 29—37.
10. Scarpa A., Williamson J. R. Calcium binding and calcium transport by subcellular fractions of heart.—In: *Calcium Binding. Proteins/* Eds. W. Drabikowski, H. Stzelecka-Golaszewska, E. Carafoli. Elsevier, Amsterdam and PWN, Warszawa, 1974, p. 547—585.
11. Levitsky D. O., Aliev M. K., Ruzmin A. V. et al. Isolation of calcium pump system and purification of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase from heart muscle.—*Biochim. biophys. Acta*, 1976, 443, 268—284.
12. Hartree E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.—*Analit. Biochem.*, 1972, 48, 422—427.
13. Makinose M., Hasselbach W. Der Einfluss von Oxalat auf den Calcium Transport Isolierter Vesikel des Sarkoplasmischen Reticulums.—*Biochem. Z.*, 1965, 343, 360—382.
14. Solaro R. J., Briggs F. N. Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle.—*Circulat. Res.*, 1974, 34, 531—550.
15. Sulakhe P. V., Drummond G. J., Ng D. C. Calcium binding by skeletal muscle sarcolemma.—*J. biol. Chem.*, 1973, 248, 4150—4157.

16. *Case D. G., Vanderkooi J. M., Scarpa A.* Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187.—Arch. Biochem. Biophys., 1974, 162, 174—185.
17. *Yamamoto T., Tomomura Y.* Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. I. Kinetic studies.—J. Biochem., 1967, 62, 558—575.
18. *Bastide F., Meissner G., Fleischer S., Post R. L.* Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase for transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of muscle.—J. biol. Chem., 1973, 248, 8385—8391.
19. *Hasselbach W., Makinose M.* ATP and active transport.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1962, 7, 132—136.
20. *Meissner G., Conner G. E., Fleischer S.* Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins.—Biochim. biophys. Acta, 1973, 298, 246—269.
21. *Degani C., Boyer P. D.* A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase.—J. biol. Chem., 1973, 248, 8222—8226.
22. *Schwartz A.* Apparent initial binding rate of calcium by canine cardiac-relaxing system.—Am. J. Physiol., 1972, 223, 608—614.
23. *Naylor W. G., Dunnet J., Burian W.* Further observations on species-determined differences in the calcium-accumulating activity of cardiac microsomal fractions.—J. Mol. cell. Cardiol., 1975, 7, 663—675.
24. *Martonosi A.* The role of phospholipids in the ATPase activity of skeletal muscle microsomes.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1967, 29, 753—757.

УДК 612.172.015.31:546.41+612.172.014.462.4:546.41

## РАЗДЕЛЕНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ КАК ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ТРЕХ ТИПОВ КАЛЬЦИЕВЫХ НАСОСОВ ТКАНЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С. ФЛАЙШЕР (S. FLEISCHER), П. ДЕФО (P. H. DEFOOR),  
Б. ЧЕМБЕРЛЕН (B. R. CHAMBERLAIN, США), Д. О. ЛЕВИЦКИЙ (СССР),  
К. ГИТЦЕН (K. GIETZEN), Х. У. ВОЛЬФ (H. U. WOLF, США)

### ВВЕДЕНИЕ

Концентрация свободных ионов  $\text{Ca}$  в цитоплазме поддерживается на уровне 0,1 мкМ, в то время как внеклеточная концентрация ионов  $\text{Ca}$  превышает 1 мМ [1, 2]. Эта большая разность концентраций  $\text{Ca}$  по обе стороны плазматической и (или) внутриклеточной мембран модулируется гормональными или возбуждающими воздействиями, открывающими, как считается, селективные каналы и обеспечивающими тем самым перенос ионов  $\text{Ca}$  через мембрану в цитоплазматическое пространство в соответствии с градиентом их концентрации. Это тонкое поддержание внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}$  представляет собой важный регуляторный механизм клетки, поскольку кальциймодулируемые реакции вовлечены в обеспечение ряда клеточных функций.



Большой градиент по Са генерируется главным образом АТФ-зависимыми кальциевыми насосами и поддерживается частично относительно низкой проницаемостью мембраны по отношению к ионам Са. Данное сообщение будет касаться деталей некоторых наших исследований систем кальциевых насосов, выделенных из трех различных мембран млекопитающих: а) саркоплазматический ретикулум скелетной мышцы, наиболее полно изученный насос ионов Са; б) сердечный саркоплазматический ретикулум, модулируемый цАМФ-зависимой протеникиназой; в) кальциевый насос плазматической мембраны эритроцитов человека, регулируемый внутриклеточной концентрацией Са подобно тому, как это наблюдается в случае цитоплазматического регуляторного белка, названного «кальцийзависимым регулятором», или «кальмодулином».

Основной подход связан с выделением и характеристикой молекул насоса и реконструкцией, приводящей к формированию функциональных мембран определенного состава. Такой реконструкционный подход позволяет упростить и детализировать исследования сложных биологических систем. Восстановление функции в реконструированных мембранах означает, что вовлеченные в выполнение функции компоненты могут быть идентифицированы и охарактеризованы, а сама машина насоса может быть изучена в деталях.

### САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ (СР)

Несколько лет назад нами были начаты исследования молекулярных основ функционирования СР мышцы кролика с тем, чтобы: 1) изолировать и охарактеризовать высокоочищенный СР; 2) разделить СР на составные элементы и выяснить зависимость функции СР от свойств составляющих его компонентов; 3) реконструировать мембранные везикулы, сходные с нормальным СР и способные к выполнению транспортной функции; 4) исследовать взаимосвязь между составом СР и его структурой, а также между структурой и функцией; 5) провести биофизические исследования мембранной структуры, в том числе вращательных параметров, обусловленных природой липид-белкового взаимодействия.

Изолирование высокоочищенного нормального СР (Н-СР) в ощутимых количествах (сотни миллиграммов белка) было достигнуто при центрифугировании с использованием зональных роторов [5]. В нашем препарате СР, как следует из данных электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 19, гель 2), преобладают три белка. Кальцийтранспортирующий белок с молекулярной массой 119 000 [6], иногда называемый также кальциевой АТФ-азой, кальцийсвязывающий белок и полипептид с молекулярной массой около 55 000, обозначаемый  $M_{55}$ , составляют соответственно 75, 10 и 10% от всего белка в очищенной фракции СР.

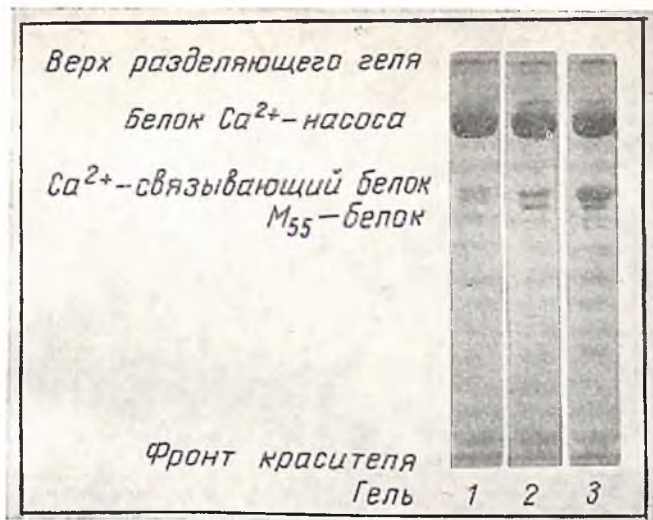


Рис. 19. Разделение СР электрофорезом в полнакриламидных гелях. 1 — легкий СР; 2 — нормальный СР; 3 — тяжелый СР.

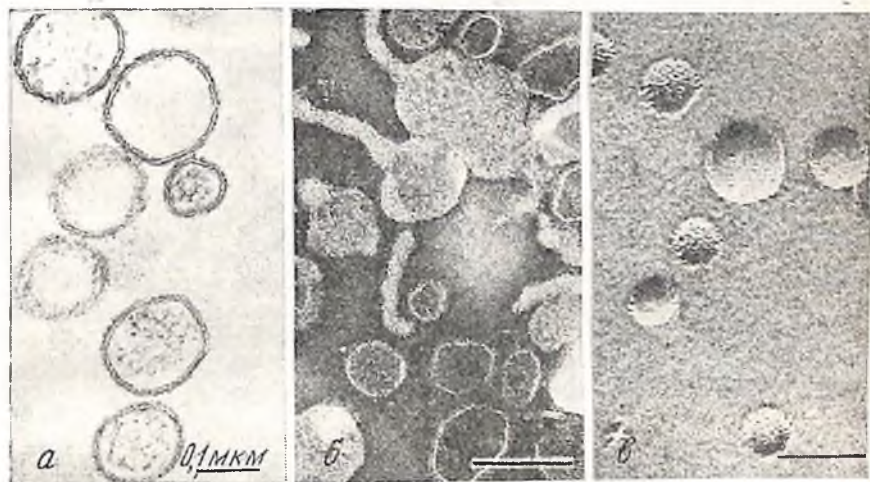


Рис. 20. Электронная микроскопия нормального СР. а — анализ тонких срезов; б — негативный контраст; в — замороженные сколы.

Морфологию нормального СР можно исследовать с помощью электронного микроскопа, используя три различных метода обработки образца (рис. 20). В тонких срезах можно выявить мембранные везикулы, имеющие трехслойную структуру (рис. 20, а). С помощью негативного окрашивания (рис. 20, б) выявляются небольшие частицы размером 4 нм, локализованные на внешней поверхности мембран [7]. Электроно-микроскопический анализ

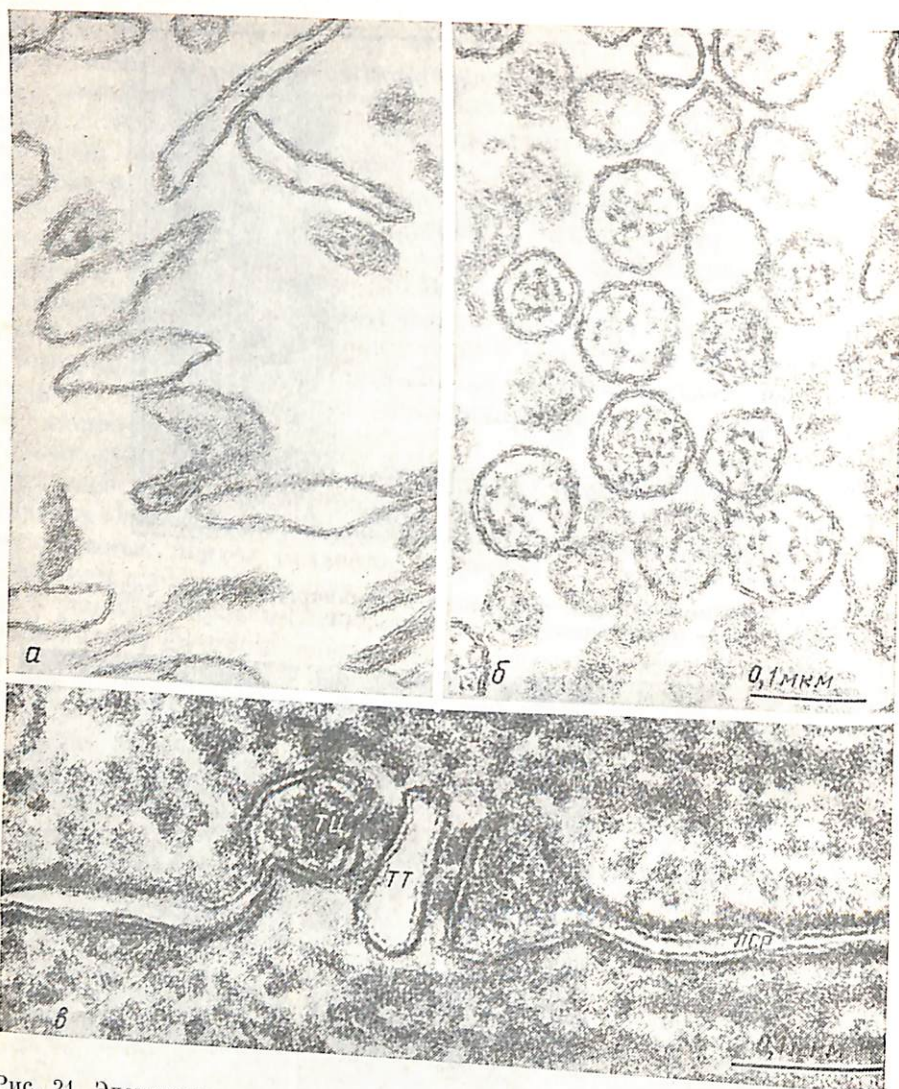


Рис. 21. Электронно-микроскопические снимки изолированного легкого (а), тяжелого (б) СР и области триад *in situ* (в). Легкий и тяжелый СР выделены из нормального СР с помощью изопокичного центрифугирования. Область триад хорошо различается в тонком срезе благодаря обработке танином. Видна асимметрия мембраны СР. Т—Т-тубула; ТЦ — терминальная цистерна СР, ЛСР — латеральная цистерна СР [10].

замороженных сколов (рис. 20, в) указывает на асимметричное распределение частиц на гидрофобных поверхностях сколов: большая часть внутримембранных частиц локализована на внешней (вогнутой) поверхности мембраны [8].

Высокоочищенный СР может быть разделен далее на «тяжелые» и «легкие» везикулы, различающиеся по изопокичной

плотности (рис. 24). Тяжелый СР содержит во внутривезикулярном пространстве электроноплотный материал (см. рис. 24, б), в то время как легкий СР (см. рис. 24, а) его практически лишен [9, 10].

На рис. 19 представлены данные о белковом составе легкого СР (гель 1), тяжелого СР (гель 3) и нормального СР, из которого оба этих препарата были получены (гель 2). Электроноплотный материал в тяжелом СР соответствует главным образом кальцийсвязывающему белку. Легкий СР представляет собой мембрану, в которой кальцийтранспортирующий белок составляет 90% или более от всего белка. Действительно, мембраны СР обогащены в значительной степени кальцийтранспортирующим белком [9, 10].

Нами были осуществлены очистка и характеристика основных компонентов СР [5]. Кальцийтранспортирующий белок содержит два кальцийсвязывающих участка, один АТФ-связывающий участок и мембранный компонент, формирующий фосфоэззимный интермеднат [4, 11].

Нормальный СР может быть диссоциирован с помощью дезоксихолата и реконструирован затем после удаления детергента с образовавшимся функционирующим мембранным везикулом [12]. Для достижения формирования функционально-активных везикул СР требуются вполне определенные условия. В частности, оцутимое энергозависимое накопление Са имеет место в том случае, если реконструкция осуществляется при 15—20°C. В реконструированном СР (Р-СР), так же как и в нормальном, основным белком является кальцийтранспортирующий. Везикулы, реконструированные с помощью описанной выше процедуры, содержат по-прежнему  $M_{55}$ , но практически утрачивают кальцийсвязывающий белок. Реконструкция также может быть достигнута с очищенным кальцийтранспортирующим белком, при этом, как и в первом случае, образуются функционирующие мембраны везикулы [13]. Таким образом, кальцийтранспортирующий белок обладает всеми характеристиками, необходимыми для осуществления переноса Са и является по всей видимости кальцийтранспортирующей молекулой. Р-СР имеет липидный состав, сходный с таковым в Н-СР (данные не приведены); что же касается способности к выполнению основной функции, то в Р-СР скорость поглощения Са и кальциевая емкость вдвое ниже, чем в исходном СР (рис. 22).

Описанная здесь процедура реконструкции имеет три ключевых момента, которые отличают ее от других [14], а именно: 1) мембранные везикулы Р-СР, подобно везикулам Н-СР, состоят преимущественно из кальцийтранспортирующего белка (160% массы) и не являются липосомами, инкрустированными следовыми количествами этого белка; 2) Р-СР не требует присутствия во внутреннем объеме таких кальцийпреципитирующих агентов, как оксалат, добавленных в среду во время формирования везикул для того, чтобы достигнуть затем энергозависимого транспорта Са;



Рис. 22. Поглощение кальция везикулами исходного и реконструированного СР во времени [12].

3) Р-СР способен к энергозависимому транспорту Са в отсутствие кальцийсвязывающего агента.

Недавно нами был разработан метод, позволивший в тонких срезах выявить асимметрию мембраны СР. При этом была произведена обработка танином, обеспечившая лучшее контрастирование [10]. Было показано, что внешний слой имеет толщину 7 нм, а внутренний и средний слой — 2 нм (см. рис. 23, а). Таким образом, асимметрия Н-СР может быть выявлена как в тонких срезах, так и с использованием негативного контрастирования (см. рис. 20, б) [7] и с помощью анализа замороженных сколов (см. рис. 20, в) [8].

С помощью танина асимметрия мембраны СР может быть выявлена в тонких срезах мышц *in situ* (см. рис. 21, в). Широкий слой (7 нм) локализован на внешней поверхности мембран СР таким образом, что ионы Са транспортируются из широкого внешнего слоя через мембрану во внутриретикулярный отсек. Такая асимметрия сохраняется и в изолированных везикулах СР (см. рис. 23, а). При изучении структуры триад (см. рис. 21, в) можно заметить, что отсек терминальной цистерны СР содержит плотный материал, в то время как в латеральных цистернах СР эта субстанция отсутствует. Эти данные свидетельствуют о том, что тяжелый и легкий СР могут происходить из терминальных и латеральных цистерн соответственно [9, 10].

Р-СР отличается от Н-СР в одном ключевом аспекте, а именно тем, что асимметрия мембран утрачивается при формировании их в пробирке. Это обнаруживается при использовании каждого из трех методов приготовления образцов для электронной микроскопии. В тонких срезах трехслойное построение мембраны Р-СР симметрично: слои имеют толщину 7, 2 и 7 нм (см. рис. 23, в). Увеличение отношения липида к белку приводит к уменьшению

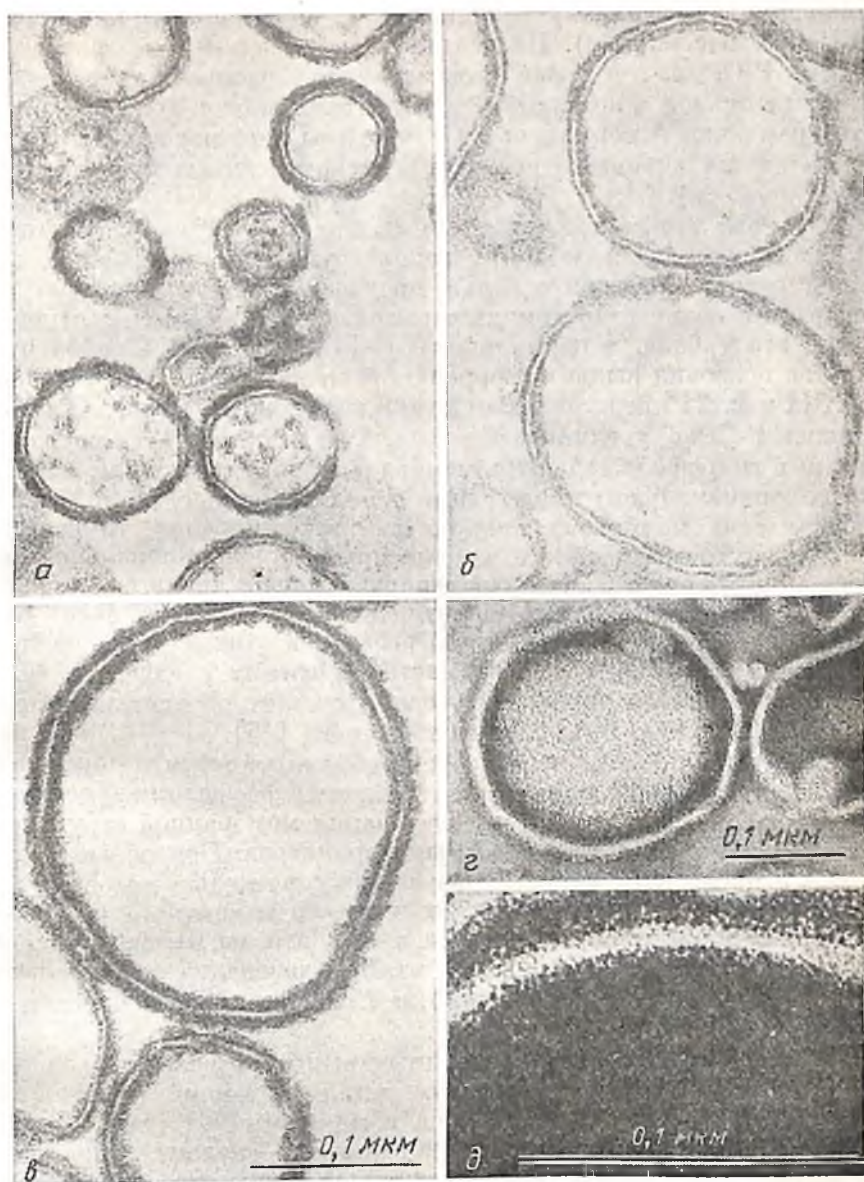


Рис. 23. СР в тонких срезах (а—в) и подвергнутый негативному контрастированию (г—д). Для лучшего контрастирования СР мембраны были обработаны танином (а, в) [10].  
 а — нормальный СР; б, в — реконструированный СР с низким и высоким содержанием белка соответственно. Отметка 0,1 мкм на снимке в соответствии увеличено для снимков а—в, г и д—негативное контрастирование реконструированного СР.

концентрации частиц на поверхностях мембран (см. рис. 23, б). При негативном контрастировании поверхностные частицы обнаруживаются как на внутренней, так и на внешней поверхности Р-СР (см. рис. 23, г, д). Из анализа замороженных сколов следует, что Р-СР имеет более симметричное расположение частиц между выпуклой и вогнутой поверхностями сколов (рис. 24, б—е), в то время как в нормальном СР частицы локализованы преимущественно на внешней (вогнутой) поверхности скола (рис. 24, а и см. рис. 20, в).

Для того чтобы приготовить мембраны Р-СР определенного фосфолипидного состава метод реконструкции был несколько модифицирован. При этом с целью проведения корреляционных исследований количество липида варьировало от  $\frac{1}{2}$  до 2 по отношению к его уровню в нормальном СР [15]. Подобный набор препаратов позволил выявить корреляцию между составом и структурой. На рис. 24 представлены снимки замороженных сколов серии везикул Р-СР с увеличивающейся долей липида. Концентрация частиц в гидрофобном центре мембраны везикул Р-СР уменьшается пропорционально концентрации белка. Поскольку до 90% всего белка в этих мембранах приходится на один белок, то концентрация внутримембранных частиц прямо пропорциональна концентрации молекул кальцийтранспортирующего белка в мембране. Число транспортирующих молекул, локализованное согласно расчетам в мембране, более чем в 2 раза превосходит число обнаруживаемых внутримембранных частиц. Поэтому следует постулировать, что данная частица в среднем состоит из двух или более молекул кальцийтранспортирующего белка [15].

Получение функционирующих мембранных везикул определенного состава и с различным соотношением фосфолипид/белок позволяет провести детальные исследования мембранной структуры, включая измерения вращательных параметров. Подробные исследования проводятся в настоящее время с помощью методов дифракции в рентгеновских лучах и ядерного магнитного резонанса совместно с I. Herbert, A. Scarpa и K. Blasie из Пенсильванского университета, A. C. McLaughlin из Брукхэвенской национальной лаборатории (Аптон, Нью-Йорк) и I. Seelig и его коллегами из Базельского университета [16].

Данные исследований, описанных выше, позволяют предположить молекулярный механизм, детализирующий ориентацию кальцийтранспортирующего белка в мембране СР (рис. 25). Основной белковый компонент мембраны СР — кальцийтранспортирующий белок. Фосфолипид, лишенный белкового компонента, имеет симметричную трехслойную структуру; толщина каждого слоя составляет приблизительно 2 нм (см. рис. 25, А, секция д). Поэтому асимметрия мембраны СР, наблюдаемая при анализе тонких срезов (секция б) и при негативном контрастировании (секция а), должна свидетельствовать об однонаправленной ориентации в мембране кальцийтранспортирующего белка, т. е. о



Рис. 24. Микроскопия замороженных сколов нормального СР (а) и реконструированного СР с различным содержанием фосфолипидов: 0,38 (б), 0,57 (в), 0,78 (г), 1,03 (д) и 1,29 (е) мкмоль фосфолипида в 1 мг белка. Соответствующее значение для нормального СР составляет 0,78 [13].



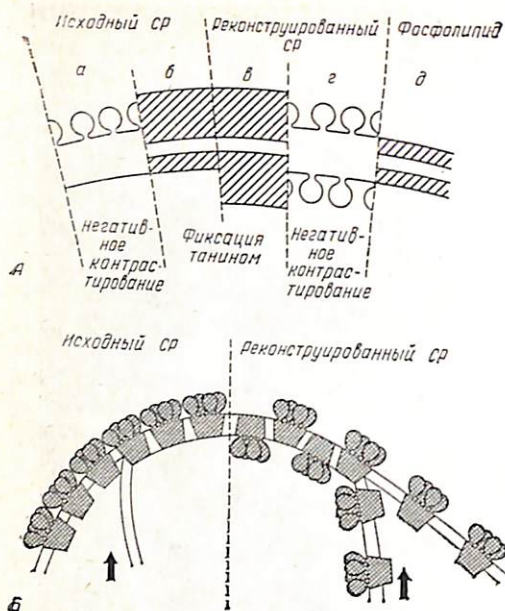


Рис. 25. Схематическое отображение структуры мембраны нормального и реконструированного СР.

А — нормальный и реконструированный СР, изображенные в соответствии с данными по негативному контрастированию тонких срезов с использованием танина. Частицы размером 4 нм, выявляемые при негативном контрастировании (секции а, г) и расширенная внешняя полоса, выявляемая при обработке тонких срезов танином, выступает на 5 нм над поверхностью (секции б, в) по сравнению с фосфолипидным слоем (секция д). Мембрана асимметрична в нормальном СР (секции а, б) и симметрична в реконструированных мембранах (секции в, г). Б — схематическое изображение везикул нормального и реконструированного СР, иллюстрирующее процесс скальвания замороженных мембран [10].

том, что часть белка выступает над внешней поверхностью липидной мембраны. Кальцийтранспортирующий белок должен иметь трансмембранную локализацию (см. рис. 25, Б), поскольку Са транспортируется через мембрану снаружи внутрь везикулы. Этот вывод соответствует данным по дифракции рентгеновских лучей и нейтронов [16]. В Р-СР насосы расположены менее упорядоченно, что обуславливает симметричную структуру, выявляемую как в тонких срезах (см. рис. 25, А, секция в), так и при негативном контрастировании (см. рис. 25, А, секция Г). Кальциевый насос определяется как трансмембранная и как олигомерная структура по причинам, изложенным выше (см. рис. 25, Б). Кальциевый насос из саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы наиболее полно изучен и является прототипом для изучения насоса из других источников, в том числе тех, которые будут описаны ниже.

## СР СЕРДЦА

СР сердечной мышцы не изолирована до той же степени чистоты, как это было сделано с препаратом из скелетной мышцы, хотя недавно разработанные методы, основанные на частичном насыщении везикул оксалатом кальция, обеспечили получение высокоактивных препаратов [17]. Согласно современным представлениям, для СР сердечной и скелетной мышц существует сходный общий механизм энергозависимого транспорта Са [18]. В то же время сердечный СР может модулироваться цАМФ-зависимой протеинкиназой, которая в СР собаки фосфорилирует

полипептид с молекулярной массой 22 000, названный «фосфоламбаном» [19]. Ускорение транспорта Са сопровождается уменьшением значения константы Михаэлиса с 1 до 0,3 мкМ. Было постулировано, что эта модуляция осуществляется посредством фосфорилирования и дефосфорилирования фосфоламбана. Это в свою очередь регулирует функцию кальцийтранспортирующего белка [19, 20]. Подобный механизм может лежать в основе хорошо известного действия катехоламинов на сердце. Однако не получено прямого доказательства связи фосфоламбана с модуляцией кальцийтранспортирующей активности. Следует также указать, что два других низкомолекулярных пептида с молекулярной массой 14 000 и 11 000 также фосфорилируются во фракциях СР сердца быка [21] и голубя [22]. Мы пытаемся осуществить диссоциацию и реконструкцию этих полипептидов, связанных с мембраной, и кальцийтранспортирующего белка сердечного СР с тем, чтобы: 1) выяснить, какой из полипептидов является модулятором; 2) изучить молекулярное взаимодействие модулятора с белком кальциевого насоса; 3) раскрыть природу модулирующего процесса.

Результаты предварительных опытов по разделению СР сердца быка на составляющие компоненты приведены в табл. 3. Со-

ТАБЛИЦА 3

РАЗДЕЛЕНИЕ СЕРДЕЧНОГО СР НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ И  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-АЗУ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКЦИЯМИ ДЕЗОКСИХАЛОМ

Образец	Выход, % исходного белка	$\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза, мкмоль/(мг·мин)	Фосфорилирование, нмоль/мг
1. Исходный СР	100	0,40	1,3
2. Первая солюбилизация: супернатант	25	0,05	4,9
осадок	58	0,51	—
3. Вторая солюбилизация: супернатант	19	0,90	—

Определение активности АТФ-азы проведено при 25 °С. Образцы, содержащие 10 и 30 мкг белка, разбавляли примерно в 150 раз реакционной средой, содержащей 1 мМ ЭГТА (базальная АТФ-аза) или 50 мкМ  $\text{CaCl}_2$ , 25 мкМ ЭГТА (общая АТФ-аза).  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФ-азная активность представляет собой разность между общей и базальной АТФ-азой. Все среды содержали 0,1% тритон X-100. Реакцию фосфорилирования проводили при 25 °С. Около 250 мкг интактного СР или 100 мкг солюбилизированного белка фосфорилировали с помощью цАМФ-зависимой протеникиназы в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ . После осаждения трихлоруксусной кислотой образцы промывали и включенную радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике. Кроме того, были сделаны коррекции на автофосфорилирование протеникиназы [21].

любилизация низкими дозами дезоксихалата избирательно экстрагирует фосфорилируемые полипептиды. Экстракт обогащается этими полипептидами в 4 раза. Селективная экстракция не наблюдается в том случае, когда полипептиды в мембране уже фосфорилированы, что свидетельствует об увеличенной связи их с

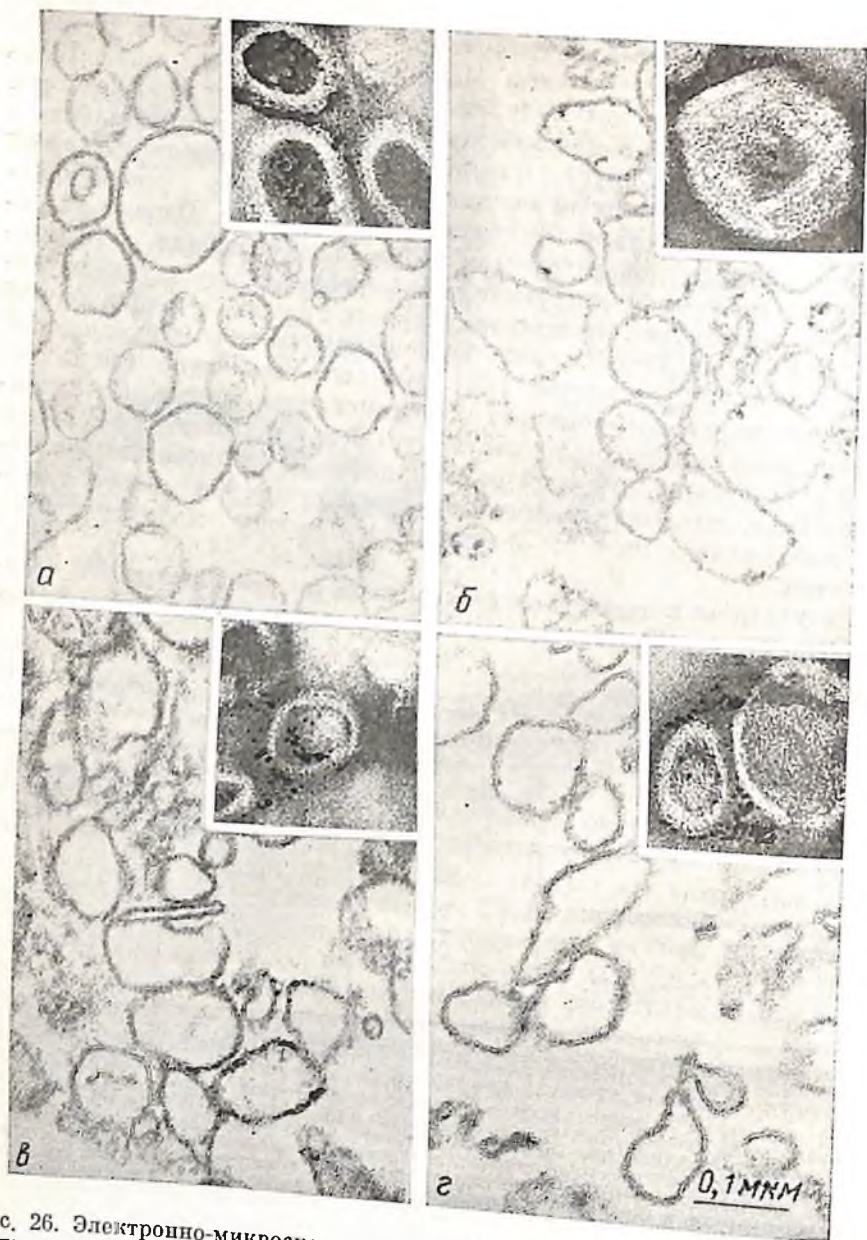


Рис. 26. Электронно-микроскопический анализ тонких срезов мембран саркоплазматического ретикулума. а — СР скелетной мышцы кролика; б — СР скелетной мышцы голубя; в — СР сердца быка. Вставки в верхних правых углах — везикулы при негативном контрастировании [23].

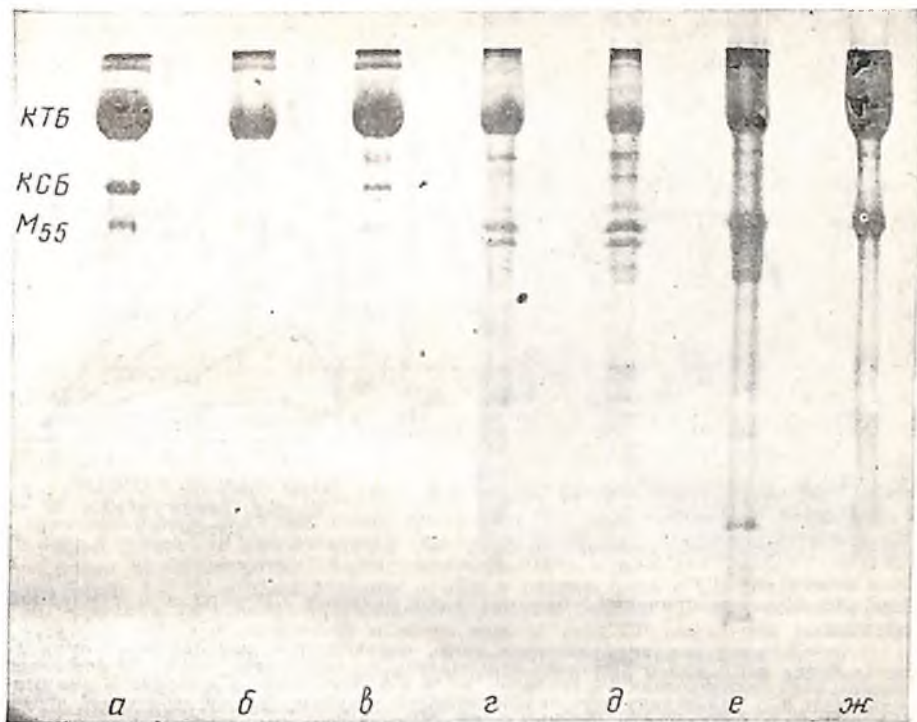


Рис. 27. Электрофоретическое разделение СР из сердечной и скелетной мышц в полиакриламидном геле. Концентрация полиакриламида составляла 5 и 11 % в концентрирующем и разделяющем гелях, соответственно. Электрофорез проводили в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия. Полосы выявляли после обработки кумасеи бриллиантовым голубым R-250. а — СР скелетной мышцы кролика (30 мкг); б — СР скелетной мышцы голуба (25 мкг); в — СР скелетной мышцы крысы (25 мкг); г — СР сердца крысы (60 мкг); д — СР сердца кролика (60 мкг); е — СР сердца быка (50 мкг); ж — СР сердца голуба (50 мкг). Обозначены также кальцийтранспортирующий белок (КТБ), кальцийсвязывающий белок (КСБ) и белок с молекулярной массой 55 000 ( $M_{55}$ ).

мембраной [19, 21]. Последующая экстракция более высокими дозами дезоксихолата приводит к солиubilизации кальцийтранспортирующего белка. Мы в настоящее время работаем над проблемой реконструкции и обеспечения большей стабильности кальцевого насоса сердца.

Другой аспект в нашей работе с сердечным СР более сложен и связан со сравнением кальциевых насосов сердечного и скелетного СР.

На рис. 26 представлены электронно-микроскопические снимки тонких срезов СР скелетной и сердечной мышц соответственно. СР сердца и скелетной мышцы имеют сходную морфологию и выглядят в тонких срезах как мембранные везикулы. На рис. 26 имеются также электронно-микроскопические снимки тех же образцов, подвергнутых негативному контрастированию. Поверхно-

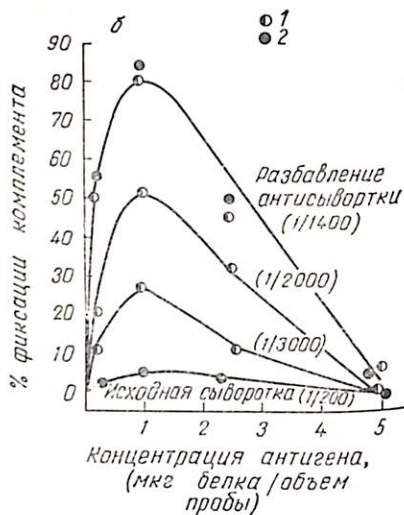
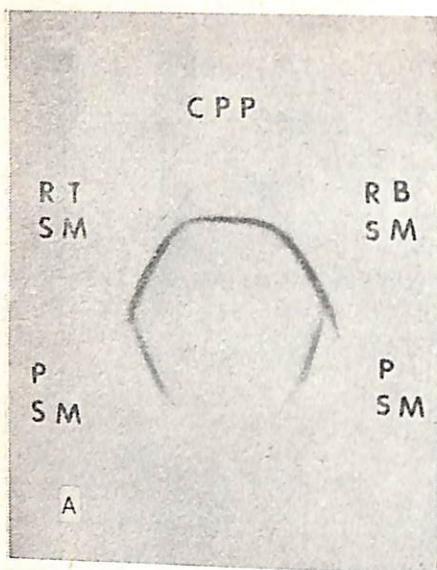


Рис. 28. Иммунологическая перекрестная реакция СР сердца и скелетной мышцы.

а — иммунодиффузия антисыворотки овцы, полученной к кальцийтранспортирующему белку и СР или очищенного кальцийтранспортирующего белка. СР скелетной мышцы солиоблизировали 1% тритоном X-100 в присутствии 38 мМ трис, 0,1 М глицина (рН 8,7). Пластинку окрашивали кумасси голубым. Сверху по часовой стрелке: 1 — кальцийтранспортирующий белок СР скелетной мышцы кролика (25 мкг); 2 — СР скелетной мышцы кролика (25 мкг); 3 — СР скелетной мышцы голубя (25 мкг); 4 — СР скелетной мышцы крысы (25 мкг); б — взаимодействие препащему белку; метод фиксации комплемента. Действие иммунной сыворотки и саркоплазматический ретикулум скелетной мышцы кролика (темные кружки) на кальцийтранспортирующий белок СР скелетной мышцы кролика [23].

стные структуры размером 4 нм, характерные для СР скелетной мышцы и обусловленные присутствием в мембране кальцийтранспортирующего белка [10], обнаруживаются и в СР сердца.

На рис. 27 приведены данные сравнения белкового состава СР скелетной мышцы кролика, голубя и крысы с составом белков в СР сердца крысы, кролика и быка. СР скелетной мышцы более прост по набору составляющих его белков. Тем не менее кальцийтранспортирующий белок является основным компонентом как в скелетном, так и в сердечном СР.

Мы приготовили антисыворотку к очищенному кальцийтранспортирующему белку из СР скелетной мышцы кролика и использовали ее для сравнения иммунологической перекрестной реактивности кальцийтранспортирующего белка скелетного и сердечного СР из нескольких источников. Опыты по иммунодиффузии с использованием этой антисыворотки выявили существование одной полосы идентичности с очищенным кальцийтранспортирующим белком из СР скелетной мышцы кролика и с СР скелетной мышцы крысы и кролика (рис. 28, а). При работе с СР скелетной мышцы голубя была обнаружена частичная идентичность, о чем

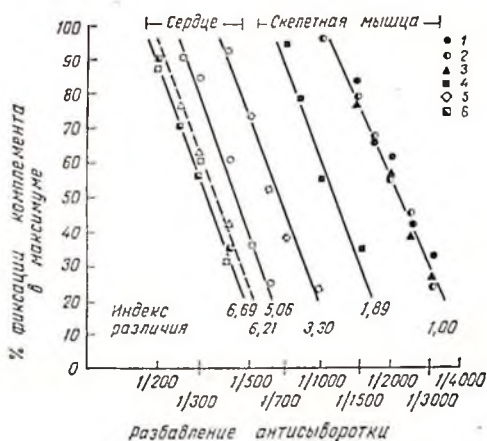


Рис. 29. Зависимость процента фиксации комплемента от концентрации антисыворотки. Каждая точка соответствует максимальному значению на кривой фиксации комплемента (см. рис. 28, б) для частных значений разведения антисыворотки. Антисыворотка овцы к кальцийтранспортирующему белку СР скелетной мышцы кролика реагировала с СР скелетной мышцы кролика (а); кальцийтранспортирующим белком СР скелетной мышцы кролика (б); СР скелетной мышцы крысы (в); СР скелетной мышцы голубя (г); СР сердца быка (д); кальцийтранспортирующим белком СР сердца голубя (е). Индекс различия вычислен при сравнении величин, полученных при 50 % фиксации комплемента.

свидетельствовало образование «шпоры» или разрыва. Препараты СР, выделенные из сердец голубя, крысы, кролика или быка, не были способны образовывать полосу преципитации, что указывает на их иммунологическое отличие от препаратов СР из скелетной мышцы, т. е. на то, что они неспособны к перекрестной реакции либо реагируют очень слабо.

Для количественной оценки реакции каждого из препаратов СР из сердца и скелетной мышцы с антисывороткой, полученной к кальцийтранспортирующему белку из скелетной мышцы был использован метод фиксации комплемента. Результаты типичного опыта приведены на рис. 28, б. С одним и тем же антигеном (в данном случае с очищенным кальцийтранспортирующим белком из СР скелетной мышцы кролика) была получена серия кривых титрования при различных разведениях антисыворотки. Максимальные значения процента фиксированного комплемента откладывали против логарифма разведения антисыворотки (рис. 29). Линия справа соответствует величинам, полученным по отношению к исходному антигену. При этом индекс различия для исходного антигена принят за 1,00 [24]. Линии, полученные для СР скелетных мышц кролика и крысы, накладываются друг на друга и идентичны линии, характеризующей кальцийтранспортирующий белок из СР скелетной мышцы кролика, что свидетельствует об иммунологической идентичности кальцийтранспортиру-

пких белков из этих двух источников. Линии, расположенные левее и полученные в результате титрования с другими препаратами, выражают различия в количественных терминах. Чем дальше друг от друга расположены линии, тем в большей степени выражено различие между препаратами. СР скелетной мышцы голубя с индексом различия 1,89 больше похож на СР скелетной мышцы крысы и кролика, чем на любой из препаратов сердечного ретикулума, каждый из которых имеет более высокие индексы: сердце быка — 3,3, сердце кролика — 5,06, сердце крысы — 6,21, сердце голубя — 6,69. Таким образом, кальцийтранспортирующий белок из СР сердца голубя в наибольшей степени отличается от СР скелетной мышцы кролика. Исходя из этих данных, мы заключили, что кальцийтранспортирующие белки СР скелетной мышцы различных видов животных более похожи друг на друга, чем на сердечный СР того же типа. Было обнаружено и дополнительное различие между видами в антигенной структуре [23].

#### ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА ЭРИТРОЦИТОВ

Кальциевый насос из плазматической мембраны эритроцитов модулируется кальцийзависимым регулятором — белком с молекулярной массой около 19 000 [25—28]. При увеличении внутриклеточной концентрации Са этот белок связывает его и в этом состоянии взаимодействует с кальцийтранспортирующим белком на внутренней стороне плазматической мембраны. При этом увеличивается способность эритроцита выбрасывать Са наружу. Такая модуляция обусловлена, по всей видимости, изменением максимальной скорости, а не константы Михаэлиса. Кальцийзависимый регуляторный белок, названный недавно кальмодулином, является посредником в реализации действия Са на ряд ферментов, включая аденилатциклазу и цАМФ-фосфорилэстеразу [29—31]. Очистка кальцийтранспортирующего белка плазматической мембраны и его реконструкция в функционирующие мембраны везикулы позволит раскрыть механизм взаимодействия кальмодулина с кальцийтранспортирующим белком и изучить природу подобной модуляции на молекулярном уровне. Работая в этом направлении, мы реконструировали недавно кальцийтранспортирующий белок теней эритроцитов [32, 33]. Схема общей процедуры представлена на рис. 30, предварительные результаты опытов — в табл. 4.

Эритроциты солиобилизовали дезоксикхолатом и реконструировали с помощью контролируемого диализа, при этом образовывались функционирующие мембранные везикулы. В результате этого удалось достигнуть десятикратного увеличения АТФ-азной активности (см. табл. 4). Реконструированные мембранные везикулы (электроно-микроскопические снимки не приведены) были способны к энергозависимой аккумуляции Са (табл. 5). В данном опыте кальмодулин был удален из реконструированного препарата. В отдельном опыте было показано, что повторное вклю-

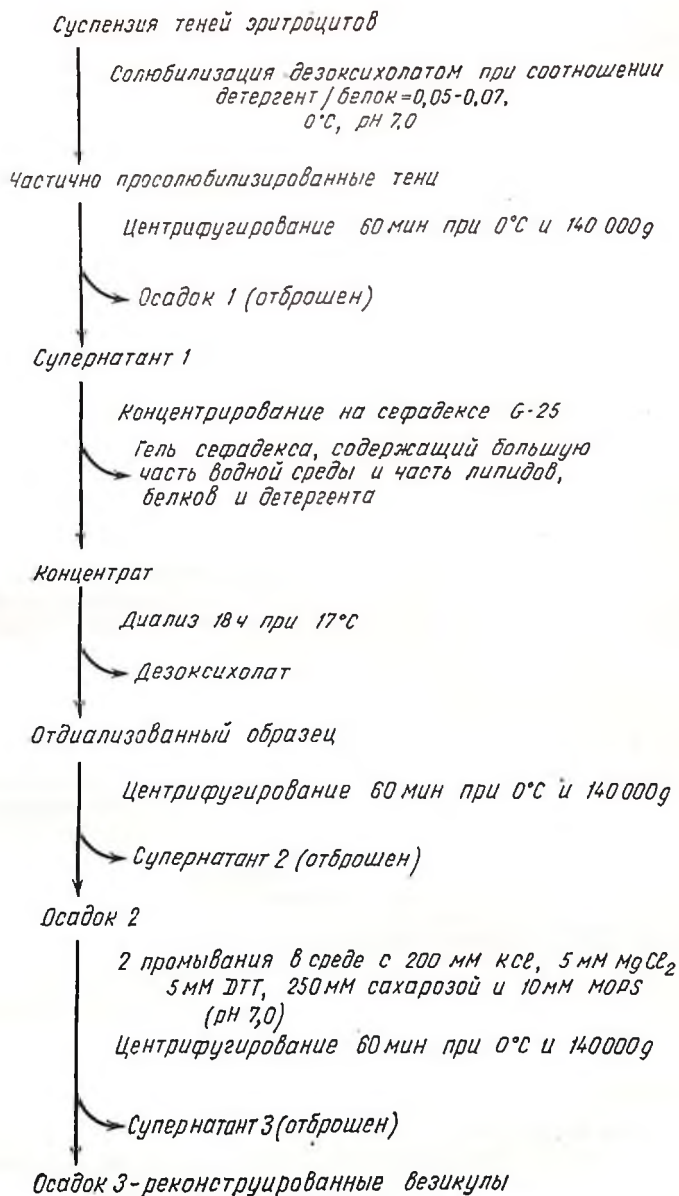


Рис. 30. Схема солюбилизации и реконструкции плазматической мембраны эритроцитов [33].

чение кальмодулина в систему приводит к шестикратному увеличению АТФ-азной активности.

Процедура реконструкции подобна той, которая была разработана для скелетной мышцы [12]. Как и ранее, было обнаруже-



ТАБЛИЦА 4

ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАКЦИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАЗДЕЛЕНИЯ И РЕКОНСТРУКЦИИ КАЛЬЦИЙТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Стадия	Общий белок, мг	Общий фосфор, мг	Фосфолипид белок мкг Ф мг белка	АТФ-аза	
				общая активность, мкмоль/мин	удельная активность, мкмоль/мин на 1 мг белка
Тени	951	17,3	18,2	24,3	25,5
Супернатант 1	380	13,5	35,5	12,5	32,9
Осадок 1	582	3,7	6,4	7,8	13,4
Концентрат	125	4,2	33,5	6,8	54,2
Супернатант 2	80,3	5,5	43,8	3,3	41,1
Осадок 2	20,3	0,53	26,1	4,0	197
Осадок 3 (реконструированные везикулы)	11,2	0,27	24,1	3,4	304

Каждая стадия обозначена также на рис. 12. В данном опыте в буфер элюции был добавлен 1 мг лецитина/мл.  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$  = зависимая АТФ-аза была измерена при 30 °С [32, 33].

ТАБЛИЦА 5

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ РЕКОНСТРУКЦИИ НА ФУНКЦИЮ КАЛЬЦИЙТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Различные условия	АТФ-аза нмоль/(мин·мг)	Поглощение $Ca^{2+}$		Эффективность $\frac{Ca^{2+}}{АТФ}$
		скорость нмоль $Ca^{2+}$ мин на 1 мг белка	емкость нмоль $Ca^{2+}$ мг белка	
Стандартные условия	95	20	105	0,21
Диализ при 0—4 °С	190	<2	<2	0,01
Диализный буфер без сахарозы	124	4	25	0,032
Буфер элюции без лецитина	112	14	39	0,12
Буфер элюции с 2 мг лецитина/мл	104	31	61	0,30

Реконструкцию осуществляли понижением концентрации детергента с помощью сефадекса g-25 и последующим диализом. Стандартные условия для реконструкции: буфер элюции содержал 1 мг лецитина в 1 мл, диализ проходил при 16—18 °С в течение 18 ч против диализного буфера.  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -АТФ-азная активность и поглощение  $Ca^{2+}$  измерены при 20 °С. Эффективность реконструированной системы кальциевого насоса выражена в молях перенесенного Са на моль прогидролизованного АТФ и рассчитана из скоростей поглощения  $Ca^{2+}$  и АТФ-азной активности регистрируемых в течение 1-й минуты [32, 33].

но, что: 1) для восстановления основной функции реконструкция должна быть проведена при температуре, близкой к комнатной, а не на холоду; 2) реконструированные мембраны могут быть приготовлены таким образом, что содержание в них липида не отличается от такового в исходном препарате мембран, т. е. в них имеется 60% белка и 40% липида. Таким образом, была продемонстрирована возможность реконструкции. В настоящее время мы намерены очистить кальцийтранспортирующий белок до гомогенного состояния и реконструировать его с целью биофизической характеристики взаимодействия его с кальмодулином и изучения модулирующего влияния последнего.

### ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Все ткани высших организмов требуют наличия кальциевых насосов для поддержания низкого внутриклеточного уровня ионов Са. Три подобных насоса, хотя и сходны по функции, но имеют различные молекулы, выполняющие эту функцию, что отражает различную природу ткани. Процедура разделения и реконструкции способствует выяснению молекулярных особенностей этих насосов и пониманию мудрости, заложенной в разнообразии природы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brinley F. J., Tiffert T., Scarpa A.* In situ measurements of free calcium with metallochromic indicators. /Eds. P. L. Dutton, J. Leigh, A. Scarpa. *Frontiers of Biological Energetics; Electrons to Tissues*, Acad. Press, New York, 1978, v. II, p. 1551—1554.
2. *Blinks J. R., Rudel R., Taylor R. S.* Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibers: Detection with aequorin.—*J. Physiol.*, 1978, 277, 291—323.
3. *Carafoli E., Crompton M.* The regulation of intracellular calcium.—In *Current Topics on Membranes and Transport*/ Ed. A. Kleinzeller. Acad. Press, New York, 1978, v. 10, 131—216.
4. *Meissner G., Fleischer S.* Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle.—*Biochim. biophys. Acta*, 1971, 241, 356—378.
5. *Meissner G., Conner G. E., Fleischer S.* Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins.—*Biochim. biophys. Acta*, 1973, 298, 246—269.
6. *Rizzolo L. J., LeMaire M., Reynolds J. A., Tanford C.* Molecular weights and hydrophobicity of the polypeptide chain of sarcoplasmic reticulum calcium (II) adenosine triphosphatase and of its primary tryptic fragments.—*Biochemistry*, 1976, 15, 3433—3437.
7. *Ikemoto N., Sreter F., Nakamura A.* Tryptic digestion and localization of calcium uptake and ATPase activity in fragments of sarcoplasmic reticulum.—*J. Ultrastruct. Res.*, 1968, 23, 216—222.
8. *Deamer D., Bashin R.* Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations.—*J. cell. Biol.*, 1969, 42, 296—307.
9. *Meissner G.* Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles.—*Biochim. biophys. Acta*, 1975, 389, 51—68.
10. *Saito A., Wang C. T., Fleischer S.* Membrane asymmetry and enhanced ultrastructural detail of sarcoplasmic reticulum revealed with use of tannic acid.—*J. cell. Biol.*, 1978, 79, 601—616.

11. *Meissner G.* ATP and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding by the  $\text{Ca}^{2+}$ -pump protein of sarcoplasmic reticulum.—*Biochim. biophys. Acta*, 1973, 298, 906—926.
12. *Meissner G., Fleischer S.* Dissociation and reconstitution of functional sarcoplasmic reticulum vesicles.—*J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 302—309.
13. *Meissner G., Fleischer S.* Calcium uptake in reconstituted sarcoplasmic reticulum vesicles.—*Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1973, 52, 913—920.
14. *Racker E.* Reconstitution of a calcium pump with phospholipid and purified  $\text{Ca}^{2+}$ -adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.—*J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 8198—8200.
15. *Wang C. T., Saito A., Fleischer S.* Correlation of ultrastructure of reconstituted SR membranes of varying lipid and protein composition.—*J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 9201—9219.
16. *Fleischer S., Wang C.-T., Hymel L.* et al. Structural studies of the sarcoplasmic reticulum membrane using the reconstitution approach.—In: *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* /Eds. E. Quagliariello, F. Palmieri, S. Papa, M. Klingenberg, Elsevier/North Holland, 1979, p. 465—485.
17. *Levitsky D. O., Aliev M. K., Kuzmin A. V.* et al. Isolation of calcium pump systems and purification of calcium ion-dependent ATPase from heart muscle.—*Biochim. biophys. Acta*, 1976, 443, 468—484.
18. *Tada M., Yamamoto T., Tonomura Y.* Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum.—*Physiol. Rev.*, 1978, 58, 1—79.
19. *Tada M., Ohmori F., Kinoshita W., Abe H.* Cyclic AMP regulation of active calcium transport across membranes of sarcoplasmic reticulum: Role of the 22000 Dalton protein phospholamban.—*Cyclic. Nucl. Res.*, 1978, 9, 355—369.
20. *Hicks M. J., Shigekawa M., Katz A. M.* Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum.—*Circulat. Res.*, 1979, 44, 384—391.
21. *Chamberlain B., Fleischer S.* Unpublished data, 1978—1979.
22. *Will H., Levchenko T. S., Levitsky D. O.* et al. Partial characterization of protein kinase catalyzed phosphorylation of low molecular weight proteins in purified preparation of pigeon heart sarcolemma and sarcoplasmic reticulum.—*Biochim. biophys. Acta*, 1978, 543, 175—193.
23. *DeFoor P., Levitsky D., Biryukova T., Fleischer S.* Immunological dissimilarity of the calcium pump protein from skeletal muscle and heart sarcoplasmic reticulum.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, In press.
24. *Prager E. M., Wilson A. C.* The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 7010—7017.
25. *Schatzman H. J., Burgin H.* Calcium in human red blood cells.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1978, 307, 125—145.
26. *Gopinath R. M., Vincenzi F. F.* Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{++})$  ATPase.—*Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1977, 77, 1203—1209.
27. *Luthra M. G., Hildenbrandt, Hanahan D. J.* Studies on an activator of the  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$  ATPase of human erythrocyte membranes.—*Biochim. biophys. Acta*, 1976, 419, 164—179.
28. *Rega A. F., Garrahan P. J., Barrabin H.* et al. Reaction scheme for the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human red blood cells.—In: *cation flux across biomembranes* / Eds. Mukohata Y, Packer, N. Y. Acad.-Press, 1979, 67—76.
29. *Cheung W. Y., Lynch T. J., Wallace R. W.* An endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase.—*Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 1978, 9, 233—251.
30. *Lynch T. J., Cheung W. Y.* Human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase: Mechanism of stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$ .—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, 194, 165—170.

31. Jarrett H. W., Penniston J. T. Partial purification of the  $\text{Ca}^{2+}$ — $\text{Mg}^{2+}$  ATPase activator from human erythrocytes; similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, 1210—1216.
32. Gietzen K., Seiler S., Fleischer S., Wolf H. U.  $\text{Ca}^{2+}$ -transport by reconstituted high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of human erythrocytes. — In: Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport/Eds: E. Quagliariello, F. Palmieri, S. Papa, M. Klingenberg. Elsevier/North Holland, 1979, p. 519—522.
33. Gietzen K., Seiler S., Fleischer S., Wolf H. U. Reconstitution of the Calcium Transport System of Human Erythrocyte. — Biochem. J. In Press, 1979.

УДК 612.172.015.36:547.495.9.015.1:577.152.273

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА КРЕАТИНФОСФАТА В КЛЕТКАХ МИОКАРДА: СОПРЯЖЕНИЕ С РЕАКЦИЯМИ ГЛИКОЛИЗА И МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ФОСФОРИЛОВАНИЕМ, ЗНАЧЕНИЕ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ КРЕАТИНКИНАЗЫ

В. А. САКС, В. В. КУПРИЯНОВ, Г. В. ЕЛИЗАРОВА, Э. К. СЕППЕТ (СССР),  
В. Э. ДЖЭКОБУС (W. E. JACOBUS) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

В течение длительного времени креатинфосфокиназные (КФК) системы в мышечных клетках рассматривались как побочные системы запасаения энергии в молекулах креатинфосфата (КФ) — так называемый энергетический буфер, который может использоваться при повышении мышечной нагрузки [1]. При этом КФК-реакция рассматривалась как находящаяся в равновесии с цитоплазматическим АТФ, а внутриклеточный транспорт энергии представлялся как пассивная диффузия АТФ из митохондрий к местам его использования в миофибриллах и в мембранных АТФ-азных реакциях [1, 2].

Однако в последние годы накопилось много данных, свидетельствующих о более активной роли КФК-систем в мышечных клетках. Было показано гетерогенное распределение разных изоферментов КФК в этих клетках [3, 4]. В миокардиальных клетках около 30—40% общей активности КФК локализовано в митохондриях благодаря наличию там специфического изофермента КФК [3, 4]. Около 40—50% активности КФК локализовано в цитоплазме (ММ- и МВ-изоферменты). Кроме того, значительная часть КФК (20%) связана с миофибриллами (ММ-изофермент), мембраной саркоплазматического ретикулума и с сарколеммальной мембраной клеток [5—7]. В митохондриях КФК локализована на внешней стороне внутренней мембраны и в присутствии креатина осуществляет эффективный синтез КФ

из митохондриального АТФ [8—11]. Было предположено, что этот изофермент функционально сопряжен с аденинуклеотид-трансферазой [10, 11], в результате чего конечным продуктом митохондриальных реакций выработки энергии при наличии креатина является не АТФ, а КФ, который переносит энергию (макроэргическая фосфатная связь) к изоферментам КФК в миофибриллах и на клеточных и субклеточных немитохондриальных мембранах [12—13]. Последние изоферменты КФК используют поступивший КФ для регенерации на местах АТФ из АДФ, образующегося в АТФ-азных реакциях [12, 13]. Согласно такой точке зрения, доступным для быстрого использования при сокращениях и транспорте ионов является не весь клеточный запас АТФ, а только та его часть, которая локализована в непосредственной близости от активных центров АТФ-аз (локальные «пулы»), находится в прямой связи с КФК и может постоянно регенерироваться за счет КФ благодаря сопряжению АТФ-азных реакций с КФК-реакциями во всех структурах, в которых протекают процессы потребления энергии (см. обзор [13]). Эта точка зрения получила подтверждение в физиологических экспериментах, в которых была продемонстрирована связь между силой сокращения сердечной мышцы лягушки и клеточным содержанием КФ в гемодинамическом состоянии сердца ([13—16], см доклад Л. В. Розенштрауха и соавт. на этом симпозиуме).

Ввиду особой важности КФК систем для энергетического метаболизма и для метаболического контроля сокращения сердечной мышцы в настоящей работе были исследованы механизмы синтеза КФ как в митохондриях, так и в цитоплазме сердечных клеток с целью выяснения факторов, регулирующих и определяющих скорости синтеза КФ. Результаты работы, особенно сравнение поведения цитоплазматической и митохондриальной КФК, показывают, что важнейшими факторами обеспечения эффективного синтеза КФ в клетке являются, по-видимому, специфическая локализация митохондриальной КФК и ее взаимодействие с другими митохондриальными системами. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о важной роли КФК-систем в регуляции процессов производства энергии в сердечных клетках.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы сердца белых беспородных крыс с массой 150—250 г.

Цитозольная фракция была экстрагирована путем гомогенизации сердец в 0,3 М сахарозном растворе, содержащем 10 мМ трис-НСI, рН 7,5, 50 мМ КСI, 5 мМ ацетата магния, 0,33 мМ дигитотрейтола и 0,1 мМ ЭДТА [17]. Условия проведения реакций подписях к рисункам. Реакцию останавливали путем смешивания отобранных из реакционной смеси проб с равным объемом холод-

ной 10%  $\text{HClO}_4$ . Примененные методы анализа концентрации АТФ, АДФ, АМФ, КФ, лактата и НАД·Н описаны в [10, 11, 17].

Митохондрии были выделены из сердец крысы, как изложено в [10]. Полярнографические эксперименты проводились в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 20 мМ трис-НСI или 10 мМ  $\text{HEPES}$ ; рН 7,4 (если рН не указан особо), 3 мМ ацетата магния, 5 мМ фосфата калия, 5 мМ пирувата калия, 2 мМ малата калия, 0,33 мМ дитиотрейтола, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Содержание креатина, КФ, АТФ и АДФ в реакционной смеси указано в подписях к рисункам. Разделение митохондрии от среды и анализ реакционной смеси проводили, как описано ранее [10, 11].

Концентрацию белка определяли биуретовым методом [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Механизм синтеза креатинфосфата, сопряженного с реакциями гликолиза в цитозоле миокардиальных клеток

Способность митохондриальной КФК эффективно синтезировать КФ из митохондриального АТФ продемонстрирована несколькими авторами [9—11]. Поскольку значительная часть клеточной КФК локализована в цитоплазме сердечных клеток, значительный интерес представляет вопрос о функциональной роли этой КФК. Логично предположить, что цитоплазматическая КФК сопряжена с гликолитическими ферментами, локализованными в той же части клетки. Для выяснения этого вопроса в данной работе была получена и использована цитоплазматическая фракция из сердца крысы, содержащая как гликолитические ферменты, так и КФК в пропорциях, близких к ним *in vivo*.

Из данных, приведенных на рис. 31, следует, что цитозоль из сердца крысы, содержащий полную гликолитическую систему и КФК, катализирует превращение глюкозы в лактат, а также сопряженный с ним синтез КФ в присутствии 20 мМ креатина. Реакцию начинали введенным АТФ (4 мМ), при этом первоначально наблюдалось быстрое снижение концентрации АТФ; одновременно происходило некоторое увеличение концентрации АДФ и КФ. Затем концентрация АТФ, достигнув минимума, возвращалась к исходному уровню; концентрация АДФ, пройдя максимум, монотонно снижалась; концентрации лактата, а также КФ после некоторой задержки возрастали приблизительно линейно. Такой ход кривых нетрудно интерпретировать. Вначале АТФ расходуется на фосфорилирование глюкозы и фруктозо-6-фосфата, а также на фосфорилирование креатина в КФК-реакции, при этом лактат в системе практически не появляется. Далее по мере накопления фосфорилированных интермедиатов гликолиза начинаются линейный рост концентрации лактата, КФ и возвращение

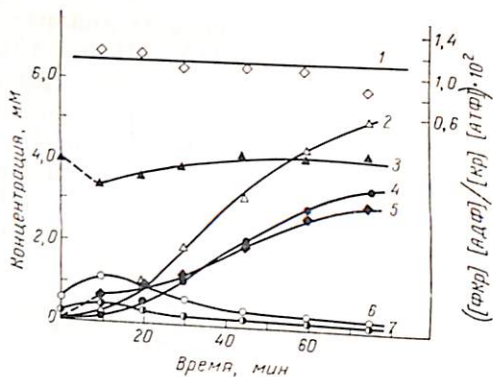


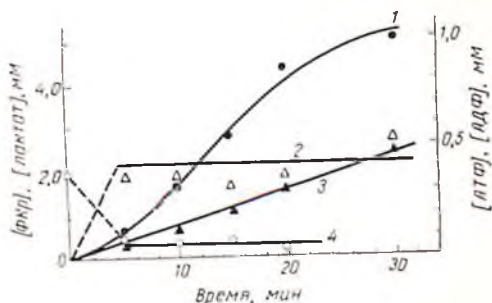
Рис. 31. Образование фосфокреатина, сопряженное с гликолитическим расщеплением глюкозы. Ордината сплошной линии вверху рисунка равна величине константы равновесия этой реакции в данных условиях ( $1,1 \cdot 10^{-2}$ ). В этом эксперименте и экспериментах, результаты которых представлены на рис. 32—35, инкубацию проводили при  $30^\circ\text{C}$  в буферной системе, состоявшей из 40—50 мМ трис-НСI, 20 мМ фосфат калия (рН 7,5), 50 мМ КСI, 6 мМ ацетат  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,33 мМ дитиотрейтол. В данном случае среда инкубации в начальный момент времени содержала также 50 мМ глюкозу, 3,9 мМ АТФ, 0,5 мМ АДФ, 0,2 мМ АМФ, 0,5 мМ НАД<sup>+</sup>, 20 мМ креатин и 1,1 мг/мл белка цитозоля.  $[\text{ФКр}][\text{АДФ}]/[\text{Кр}][\text{АТФ}] \cdot 10^2$  (1); лактат (2); АТФ (3);  $\Delta[\text{АТФ}] + \Delta[\text{ФКр}]$  (4); ФКр (5); АДФ (6); АМФ (7).

концентрации АТФ к исходному уровню. Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация лактата и изменение суммы концентраций АТФ и КФ возрастали с приблизительно одинаковой скоростью, т. е. величина  $\Delta([\text{КФ}] + [\text{АТФ}])$  для максимальных наклонов кривой около точки перегиба была близка к теоретической стехиометрии, равной 1,0. Некоторое отставание прироста суммы концентраций КФ и АТФ от прироста концентрации лактата, по-видимому, объясняется тем, что в системе не устанавливается стационарное состояние и скорость фосфорилирования гексоз может быть больше, чем  $1/2$  скорости синтеза АТФ + КФ. Интересно, что отношение действующих масс для КФК-реакции  $[\text{КФ}] \cdot [\text{АДФ}] / [\text{креатин}] \cdot [\text{АТФ}]$ , вычисленные для разных моментов времени, мало меняется во времени и практически равно кажущейся константе равновесия этой реакции в условиях наших экспериментов ( $K = 1,1 \cdot 10^{-2}$ ; значение константы равновесия было экспериментально определено в идентичных условиях с очищенной КФК). Последний факт означает, что КФК не является лимитирующим звеном всего процесса, что свидетельствует о ее способности эффективно улавливать АТФ, образующийся при гликолизе.

На рис. 32 представлены результаты экспериментов по фосфорилированию креатина, сопряженному с гликолизом, когда субстратом является фруктозо-1,6-дифосфат. В этом случае при сравнительно небольших концентрациях АДФ (0,38 мМ) накопление

Рис. 32. Синтез фосфокреатина, сопряженный с гликолитическим расщеплением фруктозо-1,6-дифосфата. Среда инкубации содержала 5 мМ фруктозо-1,6-дифосфат, 0,4 мМ АДФ, 0,5 мМ НАД<sup>+</sup>, 20 мМ креатин и 1 мг/мл белка цитозоля. Остальные условия эксперимента те же, что и для рис. 31.

1 — ФФр; 2 — АТФ; 3 — лактат;  
4 — АДФ.



КФ и лактата в системе происходит практически без задержки на фоне постоянной концентрации АТФ (0,35 мМ), почти равной концентрации первоначально добавленного АДФ. Стехиометрия образования КФ и лактата близка к теоретической ( $[КФ]/[лактат] = 2,0$ ). Стационарная скорость синтеза КФ, определенная на линейном участке возле точки перегиба, гиперболически зависит от стационарной концентрации АТФ, которая во всех случаях практически равна концентрации добавленного АДФ. В двойных обратных координатах эта зависимость довольно хорошо линейзуется, давая величину кажущейся  $K_m$  для АТФ, равную 0,25 мМ и  $V_{макс} = 0,4$  мкмоль/мин на 1 мг белка (рис. 33, б). Аналогичная зависимость для начальных скоростей КФК-реакции цитозоля в условиях, когда АТФ регенерируется не за счет гликолиза, а с помощью избытка добавленной пируваткиназы и фосфоэнолпирувата, дает для КФК в этих условиях  $K_m = 0,8$  мМ для АТФ и  $V_{макс} = 2,5$  мкмоль/мин на 1 мг белка. Различия в величинах  $V_{макс}$  и  $K_m$  для регенерации АТФ с помощью гликолиза (субстрат фруктозо-1,6-дифосфат) и для регенерации АТФ избытком пируваткиназы закономерно. Действительно, при избытке пируваткиназы концентрация АДФ практически равна нулю, концентрация КФ в начальные промежутки времени пренебрежимо мала. Иными словами, в этих условиях характеристики КФК цитозоля определяются в реакции образования КФ, когда обратная реакция не протекает. Другая ситуация имеет место в случае синтеза КФ, сопряженного с гликолизом. Здесь стационарная скорость процесса определялась в присутствии заметных концентраций синтезированного КФ (от 1,5 до 2,7 мМ), а также при наличии АДФ в среде (0,0—0,3 мМ), т. е. в условиях, когда обратная реакция дефосфорилирования КФ протекает со значительной скоростью. Наличие заметной концентрации АДФ в среде ( $[АТФ]/[АДФ] \approx 5-10$ ) означает, что гликолитическая система «не успевает» рефосфорилировать АДФ, который тормозит синтез КФ, катализируемый КФК, вынуждая ее таким образом функционировать со скоростью, задаваемой гликолизом. Именно поэтому наблюдаемая  $V_{макс}$  для синтеза КФ, сопряженного с гликолизом, в 6 раз меньше  $V_{макс}$  для самой КФК. Иначе говоря, стационарной, определяющей скоростью этого процесса, является гликоли-



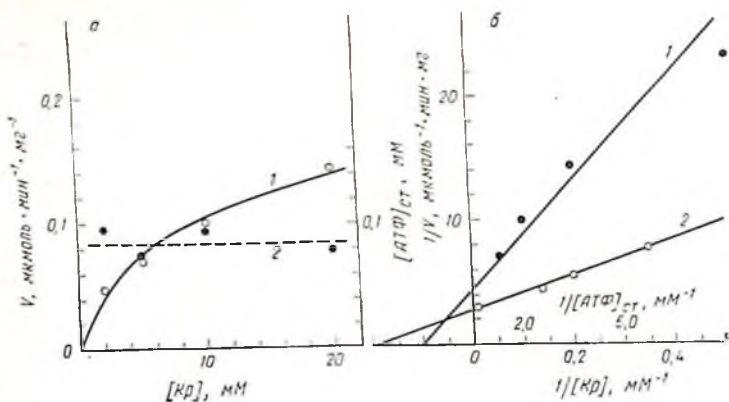


Рис. 33. Влияние стационарной концентрации АТФ и креатина на скорость синтеза фосфокреатина, сопряженного с превращением фруктозо-1,6-дифосфата.

а — зависимость начальной скорости реакции (кривая 1) от начальной концентрации креатина при фиксированной концентрации АТФ (кривая 2); б — зависимости обратной скорости реакции от обратной концентрации креатина при фиксированном АТФ (кривая 1) и от обратной концентрации АТФ при фиксированной концентрации креатина 20 мМ (линии 2). Среда инкубации содержала 5 мМ 1,6-ФДФ, 0,5 мМ НАД<sup>+</sup> и 1,1 мг/мл белка цитозоли. Остальные условия эксперимента те же, что и для рис. 31.

тическая система. К аналогичному заключению приводит анализ отношения действующих масс компонентов КФК-реакции, величина которого варьирует от  $0,96 \cdot 10^{-2}$  до  $1,2 \cdot 10^{-2}$ , т. е. всегда близка к величине кажущейся константы равновесия этой реакции ( $K = 1,1 \cdot 10^{-2}$ ).

На рис. 33, а приведена зависимость скорости образования КФ, сопряженного с гликолитическим расщеплением фруктозо-1,6-дифосфата, от концентрации креатина в среде при малых концентрациях добавленного АДФ (0,1 мМ). Указанная зависимость также имеет вид гиперболы и спрямляется в двойных обратных координатах (см. рис. 33, б), давая величину кажущейся  $K_m$  по креатину 10 мМ. Эти результаты означают, что концентрация креатина в среде эффективно контролирует скорость сопряженного с гликолизом образования КФ, причем величина  $K_m$  по креатину близка к  $K_m$  для КФК, несмотря на то что КФК-реакция не является стадией, определяющей скорость всего процесса. По-видимому, механизм такого контроля креатином заключается в том, что увеличение концентрации креатина в среде сопровождается уменьшением стационарной концентрации АТФ (см. рис. 33, а), почти равной концентрации первоначально добавленного АДФ, т. е. всегда  $(АТФ)_{ст} \gg (АДФ)_{ст}$ . К сожалению, из-за малых концентраций АДФ в этих экспериментах (1–10 мкМ) прямое определение АДФ связано с большими ошибками.

Фосфорилирование креатина протекало в условиях, когда в качестве субстрата гликолитической системы использовался фосфоенолпируват. Однако в этом случае из-за относительно легкой об-

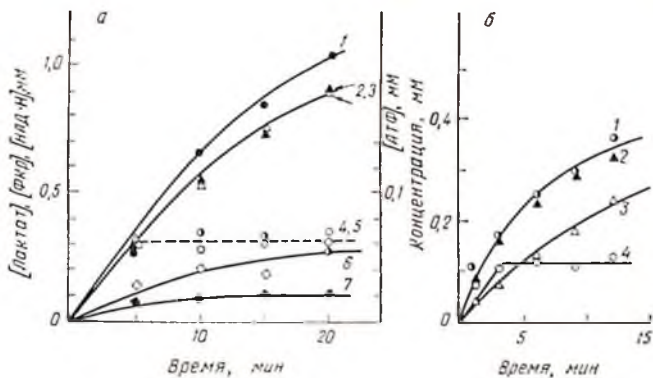


Рис. 34. Синтез фосфокреатина, сопряженный с пируваткиназной и фосфоглицераткиназной реакциями в цитозоле из клеток миокарда.

а — фосфорилирование креатина фосфоенолпируватом. Среда инкубации содержала 3 мМ ФЕП, 50 мкМ АДР, 2 мМ НАД·Н, 20 мМ NaF, 1 мг/мл белка цитозоли. В среде инкубации присутствовал 20 мМ креатин (линии 1—4) или креатин отсутствовал (линии 5—7). Лактат (линии 1—6), НАД·Н (кривые 2, 7), ФКр (кривая 2), АТФ (кривые 4, 5); б — фосфорилирование креатина 1,3-дифосфоглицератом. Среда инкубации содержала 5 мМ 1,6-ФДФ, 0,12 мМ АДФ, 2 мМ НАД<sup>+</sup>, 20 мМ NaF, 20 мМ креатин, 2 МЕ/мл добавленной глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и 0,2 мг/мл белка цитозоли. ФКр+АТФ (1); НАД·Н (2); ФКр (3); АТФ (4).

ратимости реакций гликолиза между фруктозо-1,6-дифосфатом и фосфоенолпируватом ситуация может быть более сложной. Так, в отсутствие креатина и при наличии каталитических концентраций АДФ (50 мкМ) наблюдалось окисление НАД·Н с заметной скоростью и на глубину, в несколько раз большую, чем 50 мкМ, что свидетельствовало, с одной стороны, о протекании пируваткиназной реакции, а с другой — о наличии какого-то процесса, расходующего образующийся АТФ. В присутствии креатина протекал синтез КФ, но стехиометрический коэффициент ( $[КФ]/[лактат]$ ) был заметно меньше теоретического, равного 1. Наиболее вероятное объяснение описанного явления состоит в том, что фосфоенолпируват используется также в последовательности предшествующих обратимых гликолитических реакций, давая 3-фосфоглицерат, который фосфорилируется до 1,3-дифосфоглицерата фосфоглицераткиназой с помощью АТФ, синтезированного в пируваткиназной реакции. По этой причине гликолитическая система способна окислять НАД·Н в присутствии каталитических концентраций АДФ на большую глубину благодаря своеобразному «диспропорционированию» фосфоенолпирувата. Очевидно, что стехиометрический коэффициент образования КФ был меньше 1 именно в результате конкуренции фосфоглицераткиназы с КФК за АТФ.

Введение в реакционную NaF в концентрации 20 мМ практически полностью подавляло обратную реакцию использования фосфоенолпирувата из-за ингибирования енолазы F<sup>-</sup> [18] (указанная концентрация NaF не влияла на активность пируватки-

пазы и КФК). В присутствии NaF креатин фосфорилируется фосфоенолпируватом, причем на 1 моль образовавшегося лактата появляется 1 моль КФ и окисляется такое же количество НАД·Н (рис. 34, а). Иначе говоря, стехиометрия реакции соответствует теоретически ожидаемой. В отсутствие креатина накопление лактата и окисление НАД·Н протекают очень медленно, что свидетельствует об эффективном ингибировании енолазы фторид-ионом. Стационарная концентрация АТФ в среде как в присутствии креатина, так и в его отсутствие практически не изменялась во время и была примерно равна начальной концентрации добавленного АДФ.

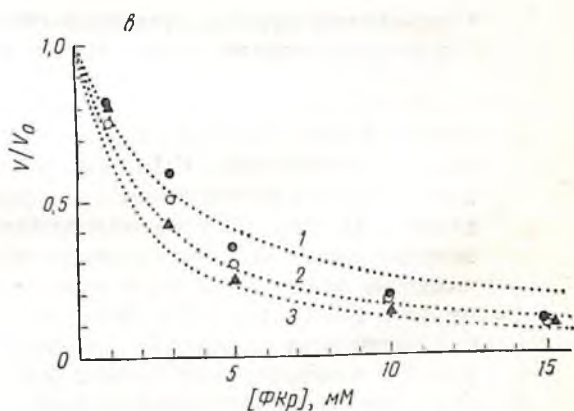
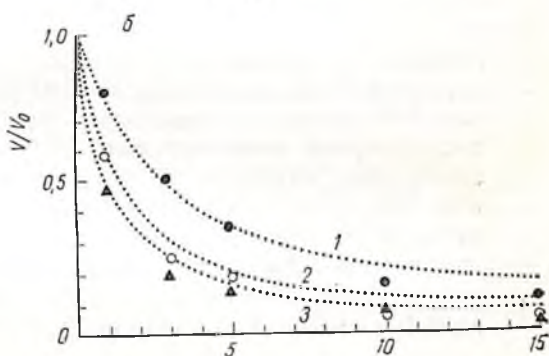
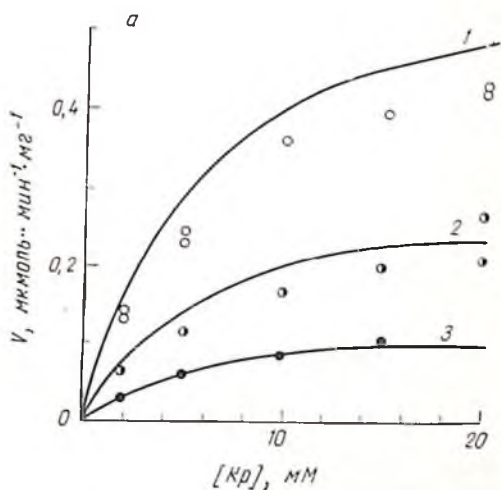
Из рис. 34, а следует также, что исключение креатина из реакционной смеси приводит к значительному уменьшению скорости образования лактата и окисления НАД·Н, так как в этих условиях прекращается постоянная регенерация АДФ в КФК-реакции.

Если в присутствии NaF, ингибирующего енолазу, в реакционную смесь вместо фосфоенолпирувата ввести фруктозо-1,6-дифосфат и избыток глицеральдегидфосфатдегидрогеназы для обеспечения быстрого синтеза 1,3-дифосфоглицерата, то при наличии креатина наблюдается синтез КФ, сопряженный с фосфоглицераткиназной реакцией (рис. 34, б).

Приведенные выше результаты показывают сопряжение всех гликолитических реакций, в которых происходит синтез АТФ, с КФК-реакцией, что приводит к синтезу КФ со стехиометрическим коэффициентом, близким к теоретическому, при практически постоянной концентрации АТФ в среде. Такое сопряжение наблюдается в гомогенной среде и, очевидно, в этом случае ферменты взаимодействуют между собой посредством установления стационарных концентраций промежуточных продуктов в среде в соответствии с их кинетическими свойствами. Используя кинетические уравнения для КФК и пируваткиназы и экспериментальные определенные значения их кинетических констант [10, 19], можно количественно описать синтез КФ, сопряженный с пируваткиназной реакцией. Результаты таких расчетов и сравнение их с экспериментальными данными показаны на рис. 35 и 36. На рис. 35 представлены стационарные скорости процесса при разных концентрациях АТФ в зависимости от содержания креатина в среде. Как экспериментальные, так и теоретические результаты практически совпадают и демонстрируют стимулирующее действие креатина и АТФ на общую скорость сопряженных реакций. Хорошее совпадение экспериментальных и теоретических результатов видно также из рис. 36, что свидетельствует о пригодности системы, состоящей из уравнений для индивидуальных ферментов, для описания сопряжения в гомогенной системе. Кроме того, рис. 36 демонстрирует высокую чувствительность системы к КФ: увеличение начальной концентрации его приводит к быстрому пирувата для производства КФ. Такое действие его согласуется с

Рис. 35. Влияние креатина и фосфокреатина на скорость синтеза фосфокреатина, сопряженного с пируваткиназной реакцией.

а — зависимость скорости реакции от концентрации креатина при разных концентрациях АТФ в среде. Сплошные кривые, представленные на рисунке, вычислены с помощью компьютера, на основании полных уравнений для креатинкиназы и пируваткиназы и численных значений кинетических констант в условиях наших экспериментов. Вычисления и экспериментальные определения проведены при следующих концентрациях АТФ: 1 — 1 мМ, 2 — 0,3 мМ, 3 — 0,1 мМ; б, в — ингибирование реакции фосфокреатином при различных концентрациях АТФ и креатина (б—10 мМ, в—20 мМ);  $V/V_0$  — относительная величина скорости реакции, где  $V_0$  — скорость реакции в отсутствие ФКр. Пунктирные кривые на рисунках вычислены с помощью компьютера, как и для рис. 35, а. Среда инкубации содержала 2 мМ ФЕП, 20 мМ NaF, 0,16 мМ НАД·Н, 0,1—1 мг/мл белка цитозоли. Скорость реакции определяли спектрофотометрически, по уменьшению концентрации НАД·Н, регистрируя уменьшение оптической плотности при 340 нм. Концентрации АТФ: 1 — 5 мМ, 2 — 1 мМ, 3 — 0,5 мМ.



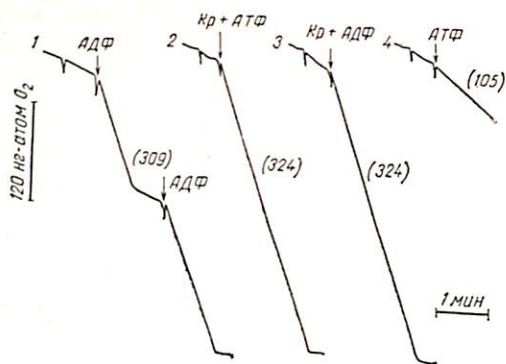


Рис. 36. Полярографические кривые регистрации поглощения кислорода митохондриями сердца. Эксперименты проводили в среде, указанной в разделе «Методы», при  $33^{\circ}\text{C}$  и pH 7,4, концентрация белка 0,4—0,5 мг/мл. 1 — стимуляция дыхания АДФ (0,3 мМ) (регистрация дыхательного контроля в отсутствие креатина); 2 — стимуляция дыхания АТФ (0,2 мМ) в присутствии креатина (25 мМ); 3 — регистрация дыхания при введении АДФ (0,3 мМ) в присутствии креатина (25 мМ); 4 — эффект АТФ (0,2 мМ) без креатина. В скобках указаны скорости поглощения  $\text{O}_2$  в н-атомах в 1 мин на 1 мг.

высоким сродством КФК к этому субстрату [10], а также с квазиравновесным положением КФК-реакции: увеличение концентрации КФ должно привести к пропорциональному уменьшению стационарной концентрации АДФ, что в свою очередь вызывает замедление пируваткиназной реакции. При начальной концентрации КФ 15 мМ скорость его синтеза в сопряженной системе ингибируется примерно на 90% (см. рис. 36). Отсюда следует, что при наличии (и поддержании) высокой концентрации КФ в среде стационарные скорости реакций гликолиза и сопряженного синтеза КФ не могут быть высокими.

### Сопряжение синтеза креатинфосфата с митохондриальным окислительным фосфорилированием

Выделенный из сердец крыс препарат митохондрий характеризуется высокой активностью КФК. В условиях окислительного фосфорилирования КФК-реакция может полностью контролировать скорость поглощения кислорода (акцепторный контроль дыхания). На рис. 36 показаны полярографические кривые регистрации поглощения кислорода митохондриями сердца крыс. Как видно из этого рисунка, в присутствии креатина и небольших количеств АТФ (0,1 мМ) наблюдается такая же скорость поглощения кислорода (кривая 2), как и при прямом введении АДФ (кривая 1); в присутствии креатина после введения и израсходования АДФ не отмечается перехода из состояния 3 в состояние 4 (кривая 3). Эти данные показывают, что митохондриальная КФК-реакция поддерживает в этих условиях такую скорость синтеза КФ и АДФ, которая обеспечивает максимальную стимуляцию реак-

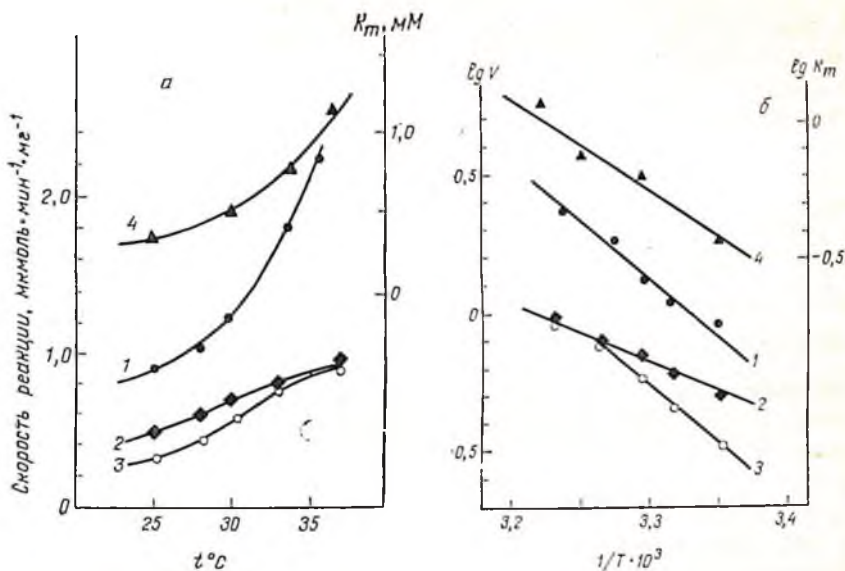


Рис. 37. а — Температурные зависимости максимальной скорости прямой митохондриальной КФК реакции (1), скорости окислительного фосфорилирования (2), скорости синтеза креатинфосфата (3) и  $K_m$  для АТФ реакции (4). Эксперименты проводили в среде, указанной в разделе «Методы» при рН 7,4. Максимальную скорость прямой КФК-реакции (синтез креатинфосфата и АДФ) и  $K_m$  для АТФ определяли путем проведения полного кинетического анализа, как описано в [10] в отсутствие окислительного фосфорилирования. Скорость окислительного фосфорилирования (синтез АТФ в матриксе) определяли по скорости поглощения кислорода, умноженной на отношение АДФ/О в каждом эксперименте (2,8—3,0), скорость синтеза креатинфосфата определяли в присутствии 25 мМ креатина и 0,3 мМ АТФ по появлению креатинфосфата в окружающей митохондрии среде. а — обычные координаты; б — линеаризация зависимостей в координатах Арренюса,  $\lg V$  против  $1/T$ .

ции окислительного фосфорилирования. Анализ окружающей митохондрии среды показал, что в экспериментах 2 и 3 КФ синтезировался со скоростью 0,9 мкмоль/мин на 1 мг белка, что свидетельствовало отношению  $[КФ]/\Delta[O_2] = 2,8$  мкмоль/мк·атом. Таким образом, в этих условиях весь синтезируемый в митохондриях АТФ используется для синтеза КФ.

На рис. 37, а приводятся сравнение максимальной скорости прямой митохондриальной КФК-реакции (синтез КФ и АДФ), определенной независимо при помощи сопрягающих ферментов [10] (кривая 1), скорости синтеза АТФ в матриксе митохондрии (кривая 2) и наблюдаемой скорости образования КФ в окружающей митохондрии среде в условиях окислительного фосфорилирования (кривая 3) при разных температурах. Видно, что при любой температуре максимальная скорость КФК-реакции превышает наблюдаемую скорость реакции окислительного фосфорилирования. Близкое совпадение кривых 2 и 3 означает, что при лю-

бой температуре в указанном диапазоне весь митохондриальный АТФ используется для синтеза КФ. Необходимо отметить, что при данной концентрации креатина максимально возможная скорость синтеза КФ равна:

$$V_{\text{макс.}} = \frac{[Kp]}{K_b + [Kp]},$$

где  $K_b$  — константа Михаэлиса для креатина;  $\frac{[Kp]}{K_b + [Kp]}$  — фактор насыщения фермента креатином. При  $Kp = 25$  мМ этот фактор равен  $\frac{25}{5+25} = 0,83$ . Учитывая этот фактор, из кривых 1 и 3 можно видеть, что в данных условиях при любой температуре реализуется больше половины максимальной активности КФК. Анализ этих зависимостей в полулогарифмических координатах Аррениуса (рис. 37, б) показывает, что митохондриальная КФК-реакция характеризуется сравнительно высокой энергией активации (96 Дж/моль), в то время как для окислительного фосфорилирования эта величина значительно меньше и равна 48 кДж/моль. Такие температурные зависимости означают, что если при низких температурах (до 33°C) скорость синтеза КФ определяется КФК, то при более высоких температурах (выше точки излома на прямой 3) лимитирующим является окислительное фосфорилирование (в данных экспериментальных условиях).

Главным выводом из этих экспериментов является заключение, что в митохондриях максимальные скорости прямой КФК-реакции превышают наблюдаемые скорости окислительного фосфорилирования (синтез АТФ в матриксе митохондрий) и, с другой стороны, в условиях окислительного фосфорилирования реализуется большая часть максимальных возможностей КФК; в этих условиях КФК не имеется в большом избытке, как в случае гомогенной среды цитозоля.

Кривая 4 на рис. 37 показывает, что  $K_m$  для АТФ в КФК-реакции заметно зависит от температуры (такой зависимости не наблюдали для  $K_m$  для креатина), что нужно учитывать при анализе температурных зависимостей скорости КФК-реакции, определяемой при ненасыщающих концентрациях субстратов [20].

Важной характеристикой ферментативных реакций являются их рН-зависимости. Поскольку рН внутриклеточной среды может значительно варьировать в разных метаболических ситуациях, значительный интерес представляет исследование сопряжения синтеза КФ с окислительным фосфорилированием при разных значениях рН. На рис. 38, а представлены зависимости от рН для максимальной скорости прямой КФК реакции митохондрий, реакции окислительного фосфорилирования и сопряженного с ним синтеза КФ.  $V_{\text{макс}}$  (кривая 1) характеризуется резкой зависимостью от рН. При рН 6,0—6,5 скорость окислительного фосфо-

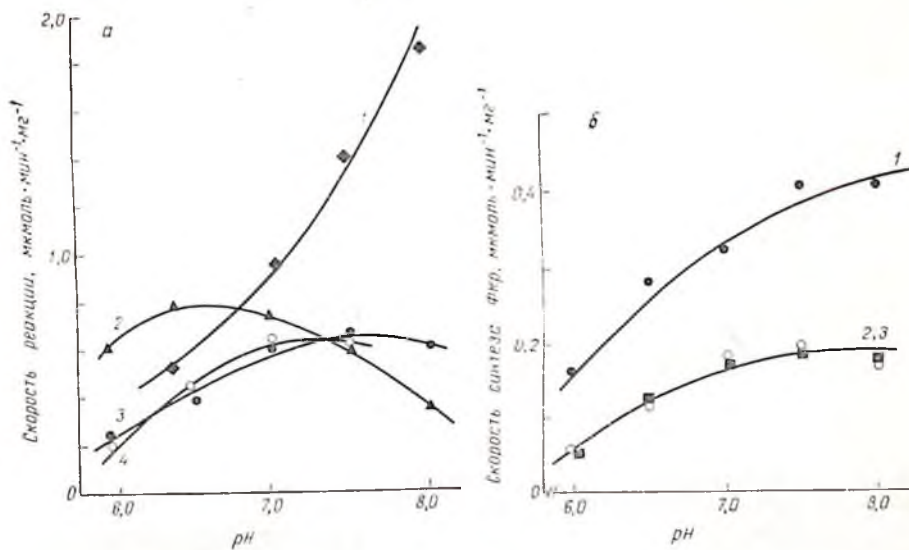


Рис. 38. Влияние рН на функциональные параметры креатинфосфокиназы. а — рН зависимости максимальные скорости прямой КФК реакции (1), скорости окислительного фосфорилирования определенной по стимуляции дыхания 0,3 мМ АДФ (2), креатинном и 0,3 мМ АТФ (3) или по изменению концентрации креатинфосфата в среде в присутствии 25 мМ креатина и 0,3 мМ АТФ (4); реакции проводили при 33 °С, как указано в подписях к рис. 36 и 37. При расчете кривых 2 и 3 скорости поглощения кислорода, измеренные после добавления АДФ или креатина с АТФ, умножали на значение АДФ/О, характерное для данного препарата митохондрий;

б — рН-зависимости реакции синтеза фосфокреатина (ФКр) в митохондриальной КФК-реакции (33 °С): 1 — синтез фосфокреатина, сопряженный с окислительным фосфорилированием в присутствии 25 мМ креатина и 0,1 мМ АТФ, 2 — синтез креатинфосфата в тех же условиях, как и для 1, после ингибирования окислительного фосфорилирования олигомицином (5 мкг/мг) и добавления в среду 3 мМ фосфоенопирувата и пируваткиназы (6 МЕ/мл) в качестве внемитохондриальной АТФ-регенерирующей системы; 3 — то же, что и для 2, но после добавления ротенона (20 мкМ) для ингибирования переноса электронов и деэргизации митохондриальной мембраны. Скорость синтеза креатинфосфата определяли по изменению его концентрации в окружающей митохондрии среде [11].

рирования (кривая 2) значительно выше наблюдаемой скорости синтеза КФ (кривые 3 и 4). Однако при рН 7,0—7,5 она практически равна скорости синтеза АТФ в матриксе (практически полное использование митохондриального АТФ для синтеза КФ).

Сравнение кривой 1 с кривыми 3 и 4 показывает, что в этой области рН реализуется значительная часть максимальной активности фермента.

Ранее было продемонстрировано, что синтезированный в митохондриях АТФ обеспечивает более высокие скорости синтеза КФ, чем АТФ, находящийся в среде в такой же концентрации [10, 11]. Как показано на рис. 38, б, это справедливо для любого значения рН; если в среде присутствует внешняя АТФ-регенерирующая система, но митохондриальное окислительное фосфорилирование ингибировано, скорость синтеза КФ значительно ниже (кривые 2 и 3), чем в условиях окислительного фосфорили-



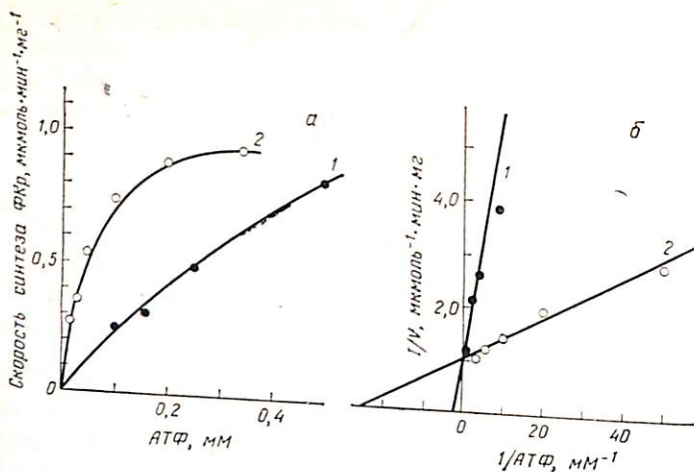


Рис. 39. Зависимость скорости синтеза фосфокреатина (ФКР) в митохондриальной КФК реакции от концентрации АТФ в среде. а — скорость синтеза креатинфосфата определяли по изменению его концентрации в окружающей митохондриальной среде при 37 °С (рН 7,4), концентрация креатина — 25 мМ; 1 — окислительное фосфорилирование заингибировано олигомицином (5 мкг/мг), концентрацию АТФ в среде поддерживали постоянной добавлением фенолпирувата (3 мМ) и пируваткиназы (6 МЕ/мл); 2 — сопряженный с окислительным фосфорилированием процесс (олигомицин и регенерирующая система отсутствовали); б — линейзация зависимости, представленных на рис. 32, а, в двойных обратных координатах. Обозначения прямых соответствуют обозначениям кривых на рис. 39, а.

рования (кривая 1) при любых значениях рН. Так как в отсутствие окислительного фосфорилирования увеличение рН от 7,0 до 8,0 не приводит к повышению скорости синтеза КФ до значений, наблюдаемых в присутствии окислительного фосфорилирования, то высокие скорости, характерные для последнего случая, не могут быть объяснены локальными изменениями рН в условиях окислительного фосфорилирования [9].

Кроме того, в присутствии олигомицина и субстратов митохондриальной мембрана энергизована за счет переноса электронов (кривая 2); в присутствии ротенона и олигомицина мембрана деэнергизована (кривая 3). Совпадение кривых 2 и 3 на рис. 38, б свидетельствует о том, что состояние энергизованности (градиент концентрации протонов и мембранный потенциал) не оказывает влияния на скорость КФК-реакции.

Повышение скорости синтеза КФ в условиях окислительного фосфорилирования связано с резким увеличением кажущегося средства системы к АТФ в этих условиях, как показано на рис. 39. Кривая 1 на этом рисунке показывает зависимость скорости синтеза КФ от концентрации АТФ в среде при 25 мМ креатине, когда окислительное фосфорилирование ингибировано и КФК взаимодействует с АТФ в среде. Линейзация этой зависимости в двойных обратных координатах (см. рис. 39, б) дает кажущуюся  $K_m$  для АТФ около 0,4 мМ, что близко к значению  $K_m$  в КФК-реакции, определенному независимо в кинетических эксперимен-

тах (около 0,6 мМ [10]). В этом случае, когда КФК митохондрии взаимодействует с АТФ в среде, ее поведение полностью определяется ее кинетическими параметрами на основе кинетического уравнения для индивидуального фермента [10]. Однако в условиях окислительного фосфорилирования зависимость скорости синтеза КФ от концентрации АТФ в среде значительно более резкая и характеризуется кажущейся  $K_m$  около 40 мкМ (см. рис. 39, б).

Таким образом, если КФК-реакция митохондрий сопряжена с окислительным фосфорилированием, добавления небольших количеств АТФ в среду достаточно для максимальной активности системы синтеза КФ. Следовательно, в этих условиях эффективность использования АТФ значительно выше по сравнению со случаем, когда окислительное фосфорилирование ингибировано. Эти данные, указывающие на значительное увеличение оборота адениннуклеотидов, когда КФК сопряжена с окислительным фосфорилированием, хорошо объясняются предположенным ранее функциональным сопряжением митохондриальной КФК с АТФ-АДФ-транслоказой (см. рис. 43) [10, 11]. В случае такого сопряжения небольшое количество АТФ, добавленного в среду, индуцирует КФК-реакцию образования КФ и АДФ, который переносится транслоказой в матрикс для синтеза АТФ. Поступающий из митохондрии АТФ благодаря близкому расположению транслоказы и КФК в (и на) митохондриальной мембране улавливается КФК без освобождения в среду и используется для синтеза КФ с освобождением АДФ, что дает начало новому циклу превращения адениннуклеотидов, многократному их использованию и эффективному к синтезу КФ в сопряженной системе. Согласно этой схеме, специфическое расположение КФК на митохондриальной мембране позволяет ей очень эффективно использовать АТФ, синтезированный в матриксе митохондрий; при этом, если окислительное фосфорилирование протекает с максимальной скоростью, КФК также функционирует со скоростью, близкой к  $V_{max}$ .

По-видимому, особое значение для энергетического метаболизма миокарда имеет тот факт, что преимущественное использование митохондриального АТФ для синтеза КФ в митохондриальной КФК-реакции наблюдается при любой концентрации КФ в среде. На рис. 40 приведены результаты двух типов опытов, в которых исследовалось действие АТФ на стимулированное креатином поглощение кислорода митохондриями при разных концентрациях КФ в среде. Поскольку при разных концентрациях АТФ отношение  $[КФ]/[O_2] \approx 2,5-2,8$  имоль/нг-атом, то стационарная скорость поглощения кислорода линейно связана со скоростью образования КФ. На рис. 40, а показаны результаты экспериментов, в которых использовались митохондрии сердца, содержащие высокую активность КФК. В отсутствие КФ и при наличии креатина в концентрации 25 мМ увеличение концентрации АТФ в среде до 0,2 мМ приводит к быстрой активации поглощения кислорода и синтеза КФ в точном соответствии с данными, приведенными на

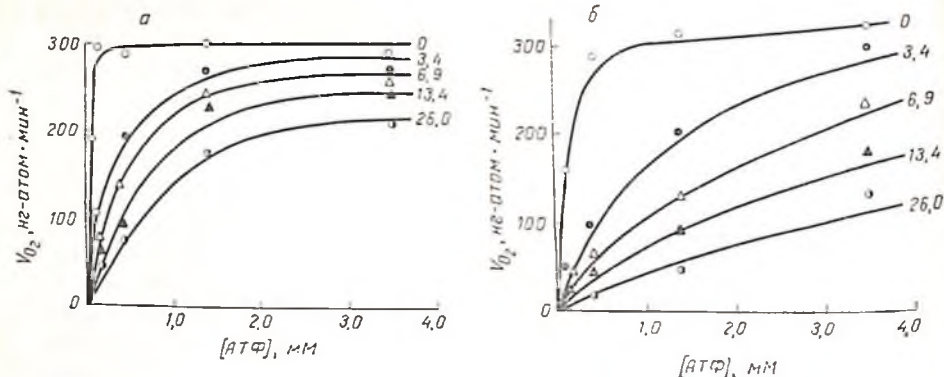


Рис. 40. Зависимость стимулируемой креатином скорости поглощения кислорода митохондриями от концентрации АТФ в среде при разных концентрациях фосфокреатина (ФКр). Температура 30 °С, рН 7,4. Поглощение кислорода определяли, как описано в разделе «Методы». Концентрации добавленного креатинфосфата указаны на рисунке справа от кривых. Концентрация креатина — 25 мМ.

а — митохондрии сердца крысы, концентрация митохондриального белка 0,6 мг/мл, активность КФК митохондрий 1,6 МЕ/мл (по обратной реакции [10]; б — митохондрии, выделенные из печени крысы, не содержащие КФК, концентрация белка 1,6—2 мг/мл. В систему была добавлена растворимая КФК, экстрагированная из митохондрий сердца фосфатом натрия [9], до активности 1,6 МЕ/мл (по обратной реакции). Концентрации (мМ) фосфокреатина указаны справа от кривых.

рис. 39. Увеличение концентрации КФ в среде уменьшает активирующее действие АТФ на митохондриальное дыхание, особенно при низких концентрациях АТФ в среде. Однако при концентрации АТФ 3,5 мМ эффект КФ не очень значительный: при концентрации КФ 26 мМ в среде скорость поглощения кислорода ингибируется только на 30% (см. рис. 40, а).

На рис. 40, б приведены результаты таких же экспериментов, в которых вместо митохондрий сердца использовали митохондрии печени, лишённые КФК. В этом случае в систему добавляли КФК, экстрагированную из митохондрий сердца, до активности, характерной для системы, использованной в экспериментах, указанных на рис. 40, б. В этом случае митохондриальная КФК взаимодействует с системой окислительного фосфорилирования митохондрии печени через АТФ и АДФ в среде. При нулевой концентрации КФ активация дыхания происходит медленнее (максимальная активация при АТР ~ 1 мМ, что аналогично случаю 1 на рис. 9), чем в случае митохондрии сердца, а при концентрации КФ 26 мМ и при 3,5 мМ АТФ поглощение кислорода ингибируется уже на 70%. Таким образом, митохондриальная КФК, находящаяся в растворе, значительно более чувствительна к ингибированию КФ, чем этот же фермент, локализованный на митохондриальной мембране. (Необходимо отметить, что кинетические свойства КФК, определённые, как указано в [10], не меняются при её экстракции из митохондрии сердца.)

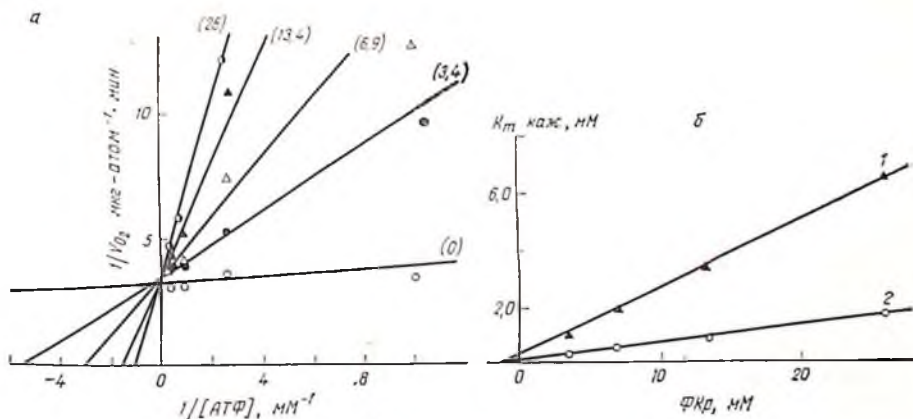


Рис. 41. Зависимости представленных на рис. 40, а, в двойных обратных координатах (а) и изменения кажущейся  $K_m$  для АТФ в реакции стимуляции синтеза фосфокреатина и сопряженного окислительного фосфорилирования в зависимости от концентрации фосфокреатина в среде (б).

а — концентрации (мМ) фосфокреатина указаны в скобках у каждой прямой. б —  $K_m$  рассчитывали из данных, аналогичных приведенным на рис. 41, а, по величине отрезков, отсекаемых на оси абсцисс прямыми, соответствующими разным концентрациям фосфокреатина. 1 — митохондрии печени + КФК<sub>мат</sub>; 2 — митохондрии сердца.

Результаты, приведенные на рис. 40, а, представлены на рис. 41, а в двойных обратных координатах.  $K_m$  кажущаяся для АТФ при нулевой концентрации КФ для митохондрии сердца равна 37 мкМ (см. рис. 39, а). Увеличение концентрации КФ приводит к конкурентному по отношению к АТФ ингибированию поглощения кислорода и синтеза КФ: при постоянном  $V_{\text{макс}}$  КФ увеличивает кажущуюся  $K_m$  для АТФ. Точно такой же характер взаимного влияния АТФ и КФ был выявлен при анализе данных, представленных на рис. 40, б (митохондрии печени с КФК в растворимой фазе). На рис. 41, б представлены экспериментально определенные кажущиеся  $K_m$  для АТФ в реакции стимуляции дыхания и синтеза КФ в зависимости от его концентрации в среде для двух исследованных случаев. Из этого рисунка видно, что кажущаяся  $K_m$  для АТФ примерно в 6—7 раз ниже для митохондрии сердца, содержащей связанную КФК, чем для митохондрии печени, когда КФК функционирует в растворе. При физиологических концентрациях КФ (20—25 мМ) скорость его синтеза в митохондриях достигает  $1/2 V_{\text{макс}}$  при АТФ около 1,2—1,5 мМ в случае митохондрии сердца, и при АТФ около 7 мМ в случае митохондрии печени с растворимой КФК.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что близкая к максимальной скорость синтеза КФ (если он присутствует в концентрации 25 мМ) в митохондриях сердца может достигаться при АТФ около 4—5 мМ. Это соответствует его физио-

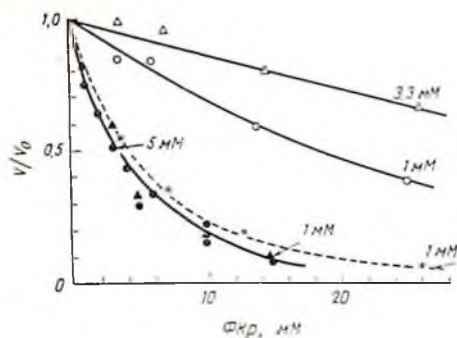


Рис. 42. Влияние креатинфосфата на стационарную скорость его синтеза в КФК реакции, сопряженной с пируваткиназной реакцией в цитоплазме (нижняя сплошная линия) с окислительным фосфорилированием в митохондриях печени в присутствии КФК сердечных митохондрий в растворе (пунктирная линия) и в случае сопряжения КФК реакции с окислительным фосфорилированием в митохондриях сердца (верхние сплошные линии). Концентрация креатина — 25 мМ; концентрации АТФ в среде указаны на рисунке. Температура 30° С, рН 7,4,  $v_0$  — скорость без фосфокреатина в среде,  $v$  — скорость реакции при данной концентрации фосфокреатина.

логической концентрации в сердечных клетках [21]. Для достижения такой же скорости в случае растворимой КФК концентрация АТФ должна подниматься до 25—30 мМ, что значительно превышает его физиологическую концентрацию.

В описанных экспериментах поведение митохондриальной КФК в растворе в присутствии митохондрии печени было аналогично ее поведению, когда она была связана с мембраной митохондрий, но окислительное фосфорилирование было ингибировано олигомицином и КФК взаимодействовала с АТФ в среде (в обоих случаях  $K_m$  для АТФ в отсутствие КФ было 200—400 мкМ; см. рис. 39 и 40, б). Сравнение чувствительности КФК в различных системах к ингибированию КФ показано на рис. 42. Одинаковая и значительная степень ингибирования наблюдается для КФК в растворе в присутствии или гликолитической системы, или митохондрии печени, в то время как КФК-реакция, сопряженная с окислительным фосфорилированием на мембране в митохондриях сердца, в соответствии с данными, приведенными на рис. 40 и 41, незначительно ингибируется КФ при АТФ выше 1 мМ. Таким образом, локализация митохондриальной КФК на внутренней мембране митохондрий сердца приводит к резкому увеличению скорости синтеза КФ из митохондриального АТФ и к уменьшению чувствительности к продуктовому ингибированию КФ. Как увеличение скорости синтеза КФ, так и уменьшение ингибирования КФК-реакции его продуктом может объясняться функционированием последней, по-видимому, переносит молекулы АТФ из матрикса митохондрии на активный центр КФК [10, 11], что приводит к быстрому насыщению его молекулами АТФ и увеличению скорости

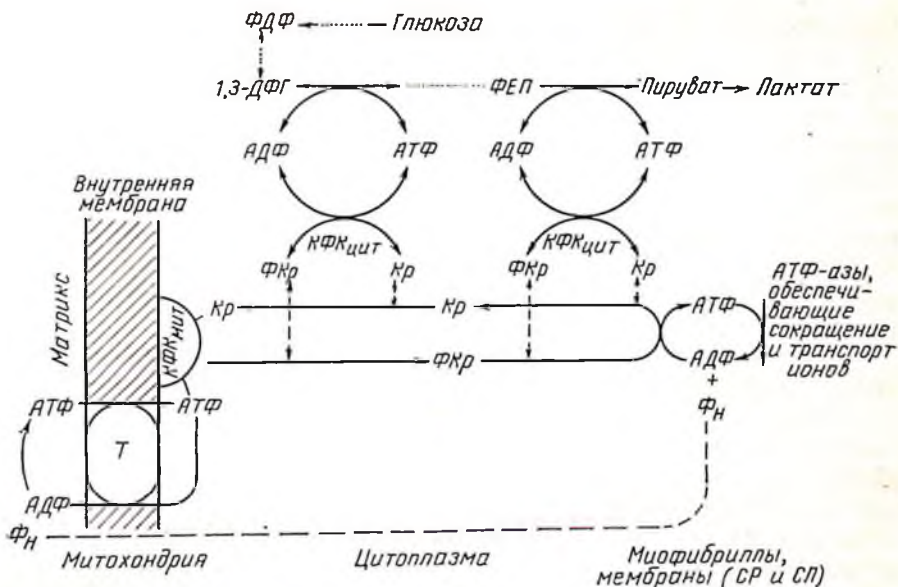


Рис. 43. Механизмы синтеза фосфокреатина в митохондриях и в цитоплазме сердечных клеток.

Т — АТФ—АДФ трансфераза; КФК<sub>мит</sub> — митохондриальная КФК, КФК<sub>цит</sub> — КФК цитоплазмы; ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфат; ФЕП — фосфоенолпируват; 1,3 ДФГ—1,3-дифосфоглицерат; Кр — креатин; ФКр — фосфокреатин.

сти прямой КФК-реакции. Так как АТФ и КФ не могут одновременно связываться с КФК из-за перекрывания концевых фосфатных групп [10, 22], быстрое насыщение КФК митохондриальным АТФ в условиях окислительного фосфорилирования препятствует связыванию КФ, что уменьшает скорость обратной реакции и ингибирование прямой КФК-реакции КФ. Такое объяснение согласуется с конкурентным характером взаимодействия АТФ и КФ (см. рис. 41, а) и уменьшением кажущегося  $K_m$  для АТФ в условиях окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца (см. рис. 41, б).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных результатов видно, что в сердечных клетках как гликолитические реакции производства энергии (АТФ), так и митохондриальное окислительное фосфорилирование сопряжены с КФК-реакциями, что в присутствии креатина обуславливает эффективный синтез КФ. Схематически эти процессы производства КФ приведены на рис. 43. Механизм функционирования КФК в двух этих системах (в цитозоле и митохондриях) различен. В цитоплазме, в которой КФК присутствует в растворимом виде, она находится в избытке по отношению к наблюдае-

мой скорости гликолиза и функционирует в квазиравновесном состоянии. В гомогенной среде КФК-реакция чувствительна к ингибированию КФ. В митохондриях благодаря локализации КФК на внутренней мембране (на ее внешней стороне) и тесному функциональному сопряжению с АТФ-АДФ-транслоказой прямая КФК-реакция ускоряется за счет преимущественного использования митохондриального АТФ. При этом КФК может функционировать со скоростью, близкой к максимальной, при низких концентрациях АТФ в среде. Такое сопряжение обуславливает также значительно меньшую степень ингибирования креатинкиназы креатинфосфатом.

В физиологических условиях, когда КФ присутствует в сердечных клетках в высокой концентрации и основными энергетическими субстратами являются жирные кислоты [23], указанные специфические особенности митохондриальной КФК-реакции позволяют ей синтезировать КФ со скоростью, равной скорости использования энергии при сокращениях и транспорте ионов, что, по-видимому, и обеспечивает высокий и постоянный уровень КФ в клетках [24]. В этих условиях гликолитические реакции из-за смещения положения равновесия цитоплазматической КФК-реакции в сторону поддержания очень низкой цитоплазматической концентрации АДФ не могут протекать со значительной скоростью. Эти реакции могут активироваться только при резком падении уровня КФ в клетках (при апокеии или ишемии). Таким образом, цитоплазматическая КФК-реакция является, по-видимому, одним из важных факторов регуляции гликолиза.

Описанные на схеме (см. рис. 43) процессы синтеза КФ и особенности митохондриальной КФК-реакции могут рассматриваться как основные механизмы, обуславливающие и обеспечивающие центральную роль КФК-систем во внутриклеточном транспорте энергии и в осуществлении метаболического контроля над сокращением (см. доклад Л. В. Розенштрауха и соавт. на этом симпозиуме). Результаты этой работы указывают также на особо важное значение локализации фермента в клетке для регуляции его активности.

Авторы выражают благодарность М. В. Емелину за выполнение расчетов по моделированию сопряженных КФК и пируваткиназной реакций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mommaerts W. F. H. M.* Energetics of muscular contraction. — *Physiol. Rev.*, 1969, 49, 427—508.
2. *Newsholm E. A., Beis I., Leech A. R., Zammit V. A.* The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. — *Biochem. J.*, 1978, 172, 533—537.
3. *Scholte H. R.* On the triple localization of creatine kinase in heart and skeletal muscle cells. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, 305, 413—427.
4. *Saks V. A., Chernousova G. B., Voronkov Yu. I.* et al. Study of energy transport mechanism in myocardial cells. — *Circulat. Res.*, 1974, 34—35 (Suppl. III), 138—149.

5. *Saks V. A., Chernousova G. B., Vetter B.* et al. Kinetic properties and functional role of particular MM isoenzyme of creatine phosphokinase bound heart muscle myofibrils.—*FEBS Lett.*, 1976, 62, 293—296.
6. *Sharov V. G., Saks V. A., Smirnov V. N., Chazov E. I.* An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells.—*Biochim. biophys. Acta*, 1977, 468, 495—501.
7. *Levitsky D. O., Lerchenko T. S., Saks V. A.* et al. The role of creatine phosphokinase in supplying energy for the calcium pump of heart sarcoplasmic reticulum.—*Membrane Biochem.*, 1978, 2, 81—96.
8. *Scholte H. R., Weijers P. J., Wij-Peters E. M.* Localization of mitochondrial creatine kinase and its use for the determination of sidedness of submitochondrial particles.—*Biochim. biophys. Acta*, 1973, 291, 764—773.
9. *Jacobus W. E., Lehninger A. L.* Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport.—*J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 4803—4810.
10. *Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E.* et al. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of  $Mg^{2+}$ -ions.—*Eur. J. Biochem.*, 1975, 57, 273—290.
11. *Saks V. A., Lipina N. V., Smirnov V. N., Chazov E. I.* Studies of energy transport in heart cells. The functional coupling between mitochondrial creatine kinase and ATP-ADP translocase: kinetic evidence.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, 173, 34—41.
12. *Gydbjarnason S., Mathes P., Ravens K. G.* Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle.—*J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1970, 1, 325—339.
13. *Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Smirnov V. N., Chazov E. I.* Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism.—*Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1978, 56, 691—706.
14. *Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Undrovinas A. I.* et al. Studies of energy transport in heart cells. Intracellular creatine content as a regulatory factor of frog heart energetics and force of contraction.—*Biochem. Med.*, 1976, 16, 21—36.
15. *Rosenshtraukh L. V., Saks V. A., Undrovinas A. I.* et al. Studies of energy transport in heart cells. The effect of creatine phosphate on the frog ventricular contractile force and action potential duration.—*Biochem. Med.*, 1978, 19, 148—164.
16. *Vassort G., Venture-Clapier R.* Significance of creatine phosphate on the hypodynamic frog heart.—*J. Physiol. (London)*, 1977, 269, pp. 86—87.
17. *Куприянов В. В., Сэннер Э. К., Сакс В. А.* Образование креатинфосфата, сопряженное с гликолитическими реакциями в цитозоле клеток миокарда.—*Биохимия*, 1978, 43, 1468—1477.
18. (*Lehninger A. L.*) *Ленинджер А. Л.* Биохимия: Пер. с англ.—М.: Мир, 1974.
19. *Куприянов В. В., Сэннер Э. К., Емелин И. В., Сакс В. А.* Стационарная кинетика мышечной пируваткиназы.—*Биохимия*, 1979, 44, 104—115.
20. *Watts D. C.* (1971) Creatine kinase.—In: *The Enzymes*/ Ed. P. Boyer. Acad. Press Inc., New York, V. 8, p. 383—455.
21. *Kubler W., Katz A. M.* Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart: possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation.—*Am. J. Cardiol.*, 1977, 40, 467—471.
22. *Morrison J. F., Cleland W. W.* Isotope exchange studies of the mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate: creatine phosphotransferase.—*J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 673—683.
23. *Neely J. R., Morgan H.* Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of the heart muscle.—*Ann. Rev. Physiol.*, 1974, 36, 413—459.
24. *Williamson J. R., Ford C., Illingworth J., Safer B.* Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux.—*Circulat. Res.*, 1976, 38 (Suppl. 1), 39—51.



## РЕГУЛЯЦИЯ КРЕАТИНФОСФАТОМ МЕХАНИЧЕСКОЙ И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИПОДИНАМИЧЕСКОГО МИОКАРДА

Л. В. РОЗЕНШТРАУХ, В. А. САКС, В. М. ШАРОВ, И. А. ЮРЯВИЧУС,  
Е. И. ЧАЗОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Сила сокращения сердечной мышцы может регулироваться с помощью воздействий на внутриклеточные креатинфосфокиназные (КФК) системы [1, 2]. Активация митохондриальной КФК-реакции с помощью креатина увеличивает силу сокращения фрагмента миокарда желудочка лягушки в условиях, когда внутриклеточное содержание креатина и сила сокращения снижены после длительной перфузии мышечной полоски сердца нормальным раствором Рингера. Параллельно уменьшению силы сокращения и снижению внутриклеточного содержания креатина уменьшалось внутриклеточное содержание креатинфосфата (КФ) [1, 2]. Эти данные, подтвержденные недавно Vassort и Ventura-Clapier [3], свидетельствуют о том, что феномен снижения силы сокращения миокарда в результате длительной перфузии, получивший в литературе название гиподинамического состояния [4, 5], обусловлен уменьшением внутриклеточного содержания КФ. Таким образом, физиологические эксперименты [1—3] подтверждают представление о том, что транспорт энергии в клетках миокарда осуществляется КФ [6, 7].

В настоящем сообщении представлены данные дальнейшего изучения роли КФК-систем в регуляции работы сократительного миокарда; основное внимание уделено исследованию действия КФ на силу сокращения, трансмембранный потенциал действия, медленный входящий кальциевый ток гиподинамического миокарда желудочков и предсердий лягушки.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Регистрация силы сокращения и трансмембранных потенциалов действия.** Эксперименты проводились на небольших полосках предсердий и желудочков лягушек *Rana ridibunda*, *Rana temporaria*. Полоски помещали в перфузионную камеру и перфузировали раствором Рингера следующего состава (в мМ):  $N^+$  — 112,8;  $K^+$  — 2,7;  $Ca^{2+}$  — 1,8;  $Cl^-$  — 117;  $HCO_3^-$  — 1,8; pH 7,4. После периода перфузии в нормальном растворе Рингера полоски перфузировали раствором, содержащим 10, 20, 50 и 70 мМ КФ. В течение эксперимента полоски стимулировали прямоугольными импульсами (длительность 3—5 мс; интенсивность стимулов в

$1\frac{1}{2}$ —2 раза превышала порог). Механическую активность и потенциалы действия регистрировали соответственно с помощью механоэлектрического датчика и стеклянных микроэлектродов.

**Регистрация медленного входящего тока.** Ионные токи регистрировали от изолированных трабекул предсердия *Rana ridibunda*. Трабекулу (75—120 мкм в диаметре и 3—5 мм длиной) помещали в перфузионную камеру, состоящую из 5 отсеков [8]. Средний тестирующий отсек (ширина 200 мкм) изолирован сахарозными мостиками (ширина 400 мкм) от двух крайних отсеков: крайние отсеки заполнены деполяризующим раствором KCl. Стенки между отсеками перфузионной камеры смазывали вазелиновым маслом. Для регистрации мембранного потенциала и тока использовали низкоомные (менее 5 кОм) внеклеточные Ag — AgCl-электроды.

Тестирующий отсек камеры перфузировали нормальным раствором Рингера; крайние отсеки камеры заполняли раствором Рингера, содержащим 140 мМ KCl. Отсеки сахарозных мостиков перфузировали раствором сахарозы (240 мМ), очищенной на ионообменных колонках.

Мембранный потенциал фиксировали с помощью специального усилителя «Dagan-8500 (США)». Командные сигналы подавали от изолирующего блока стимулятора «Digipulser»-800, «Isopulser»-850, WPI (США). Трансмембранные токи регистрировали с экрана запоминающего осциллоскопа «Tektronix» D13 (США) поляроидной камерой либо записывали на магнитофон «Hewlett Packard» 3964A (США) для дальнейшего анализа.

До регистрации медленного входящего тока предсердную трабекулу обрабатывали тетродотоксином ( $10^{-6}$  г/мл) для блокирования быстрого внутрь направленного тока. Все эксперименты проводили при комнатной температуре.

**Электронно-микроскопические исследования.** Для электрофизиологических исследований брали полоски ткани миокарда, которые перфузировали нормальным раствором Рингера в течение такого времени, которого было достаточно для уменьшения силы сокращения до 30—40% от исходной величины [1, 2]. Контрольный материал получали от интактного сердца лягушки. Препарат фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на 0,1 М кокадилатном буфере (рН 7,4) с последующей дофиксацией в 1% растворе осмиевой кислоты на 0,2 М кокадилатном буфере и заключали в смесь эпон — аралдит. Срезы готовили на ультратоме «ЛКВ» (Швеция), контрастировали их уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали под электронным микроскопом JEM 100В (Япония).

Использованные вещества: КФ — фирма «Reanal», тетродотоксин — фирма «Sankyo», цианид натрия — фирма «Merck».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Ультраструктура миоцита гиподинамического миокарда

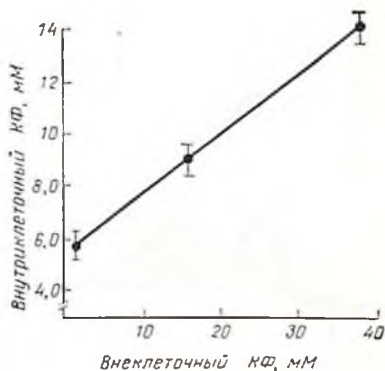
Длительная перфузия фрагмента сердца лягушки приводит к гиподинамическому состоянию: силу сокращения миокарда удастся восстановить до исходной величины добавлением в перфузат креатина, восстанавливающего исходный уровень КФ в клетках



Рис. 44. Ультраструктура миоцита полоски желудочка сердца лягушки после 8 ч перфузии нормальным раствором Рингера.  
а — сократительный аппарат клетки.  $\times 40\ 000$ ; б — скопление гликогена (Гл) в миокардиальной клетке  $\times 40\ 000$ .

Рис. 45. Зависимость внутриклеточной концентрации КФ от его концентрации в перфузате. На графике отложены средние величины и стандартные отклонения по данным 4—8 опытов.

По оси абсцисс — содержание КФ в перфузате (мМ); по оси ординат — внутриклеточная концентрация КФ (мМ).



[1, 2]. Чтобы однозначно интерпретировать полученные результаты, необходимо выяснить, не связано ли развитие гиподинамического состояния с изменением ультраструктуры клеток. С этой целью проведены контрольные морфологические исследования, в которых сравнивали ультраструктуру мышечных клеток интактного миокарда сердца лягушки с ультраструктурой клеток полоски желудочка после 8 ч перфузии нормальным раствором Рингера. При сопоставлении этих двух групп клеток не было выявлено различий в структуре саркомеров и митохондрий и в строении межклеточных контактов. Кроме того, после 8 ч перфузии клетки сохраняли также значительное количество гликогена (рис. 44). Наблюдавшаяся картина строения клеток совпадала с данными литературы [9, 10]. Таким образом, уменьшение силы сокращения (гиподинамическое состояние) препарата не связано с нарушением ультраструктуры клеток. Эти данные показывают, что наблюдавшееся действие креатина [1, 2] обусловлено его влиянием на внутриклеточные энергетические системы.

Если увеличение силы сокращения под действием креатина объясняется увеличением скорости синтеза КФ в митохондриях, что приводит к изменению внутриклеточного содержания его и в итоге числа оборота АТФ около миофибрилл [11], то к значительному увеличению силы сокращения должно привести добавление в перфузат вместо креатина энергетического субстрата — КФ. Естественно, что возрастание силы сокращения по такому механизму возможно лишь в том случае, если миокардиальные клетки проницаемы для КФ.

### Проницаемость креатинфосфата в клетки гиподинамического миокарда

Эксперименты проводили на изолированном препарате сердца, желудочек которого работал против гидростатического давления в 50 мм вод. ст. После 40-минутного периода перфузии раствором Рингера, содержащим КФ (10, 20, 40 мМ), определяли его тканевое содержание и рассчитывали внутриклеточную концентра-

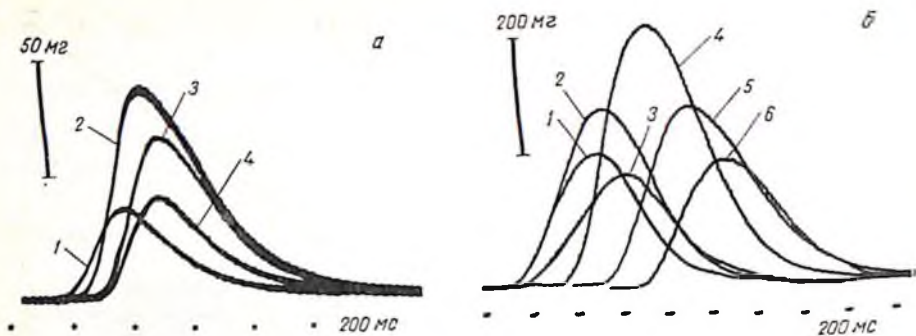


Рис. 46. Влияние КФ в разных концентрациях на механическую активность миокардиальной полоски желудочка лягушки.

а: 1 — исходная сила сокращения после 8 ч перфузии нормальным раствором Рингера; 2 — от 2,5 до 10 мин перфузии раствором Рингера, содержащим 10 мМ КФ, 3, 4 — 5 и 25 мин отмывания нормальным раствором Рингера; б: 1 — исходная сила сокращения после 5 ч перфузии нормальным раствором Рингера; 2, 3 — 1-й и 10-й минуты перфузии раствором Рингера, содержащим 70 мМ КФ, 4—6 — 5-й, 45-й и 50-й минуты отмывания нормальным раствором Рингера.

цию [1]. Данные этих экспериментов, представленные на рис. 45, показывают, что внутриклеточная концентрация КФ находится в линейной зависимости от его концентрации в растворе.

### Влияние креатинфосфата на силу сокращения и трансмембранный потенциал действия

Перфузия мышечной полоски раствором, содержащим 10 мМ КФ, вызывала увеличение силы сокращения в первые 2½ мин перфузии (рис. 46, а), и в дальнейшем сила сокращения сохранялась на высоком уровне в течение всего 10-минутного периода перфузии (рис. 46, а, 2). Последующее отмывание нормальным раствором Рингера сопровождалось постепенным уменьшением силы сокращения, которая к 25-й минуте отмывания стала равной исходной величине (рис. 46, а, 3, 4).

Увеличение концентрации КФ в перфузате до 70 мМ приводило к более сложному влиянию на силу сокращения. В первую минуту перфузии, как и в случае низкой концентрации КФ, сила сокращения увеличивалась (кривая 2 в сравнении с кривой 1 на рис. 46, б), однако последующая перфузия сопровождалась уменьшением силы сокращения, которая к 10-й минуте становилась меньше исходной (рис. 46, б, 3). Подавление силы сокращения снималось при отмывании нормальным раствором Рингера. Более того, сила сокращения в течение 5 мин отмывания возросла и становилась больше, чем в первоначальный момент стимуляции, вызванной введением КФ (кривая 4 в сравнении с кривой 2 на рис. 46, б).

Более наглядно действие различных концентраций КФ на силу сокращения одного и того же препарата можно продемонстриро-

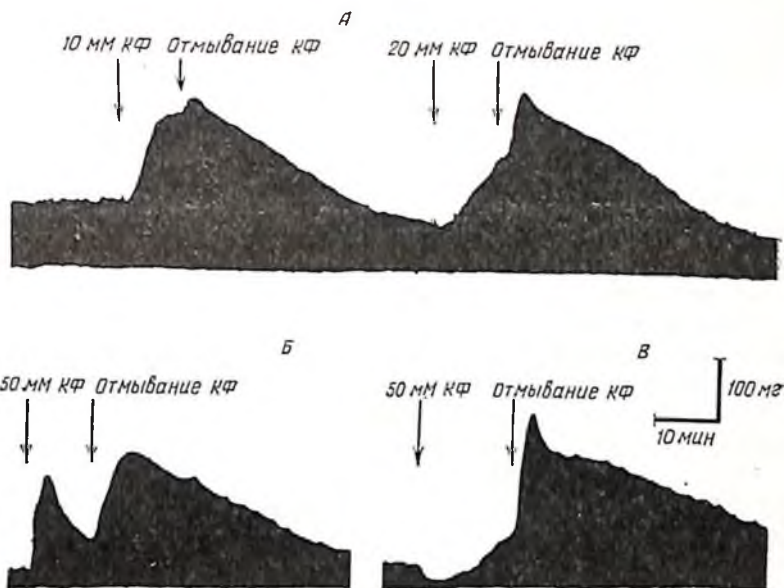


Рис. 47. Влияние КФ на силу сокращения полоски миокарда желудочка лягушки.

а — непрерывная регистрация силы сокращения после предварительной перфузии в течение  $3\frac{1}{2}$  ч нормальным раствором Рингера. Стрелками отмечено начало и конец перфузии раствором Рингера, содержащим соответственно 10 мм и 20 мм КФ; б — изменение силы сокращения полоски миокарда желудочка лягушки при перфузии раствором Рингера, содержащим 50 мм КФ; в течение всего периода перфузии концентрации натрия поддерживалась на постоянном уровне и составляла 113 мм; в — изменение силы сокращения полоски миокарда желудочка лягушки при перфузии раствором Рингера, содержащим 50 мм КФ. Во время тестирования КФ общая концентрация натрия в растворе составляла 213 мм. Регистрации, приведенные на рис. А, Б, В, получены в ходе одного эксперимента. Время перфузии нормальным раствором Рингера между записями, приведенными на рис. А и Б, составляло 40 мин, а между записями, приведенными на рис. Б и В, — 45 мин.

вать на примере непрерывной регистрации механической активности (рис. 47). На рис. 47, А показана непрерывная регистрация силы сокращения мышечной полоски при перфузии раствором Рингера, содержащим 10 и 20 мм КФ. В этих концентрациях КФ быстро и значительно увеличивал силу сокращения, которая поддерживалась на этом уровне весь 10-минутный период. В период отмывания нормальным раствором Рингера сила сокращения восстанавливалась за 30—40 мин. При повышении концентрации КФ до 50 или 70 мм сократительный ответ менялся более сложным образом; при этом была выявлена определенная роль повышения концентрации натрия в реакции полоски миокарда.

На рис. 47, Б показано влияние КФ в концентрации 50 мм; концентрация натрия в растворе Рингера поддерживалась на нормальном уровне (113 мм). На этом рисунке видно, что в течение первых минут действия КФ сила сокращения увеличивалась, однако затем она спонтанно уменьшалась; в период отмывания нормальным раствором Рингера сила сокращения быстро возрос-

да и затем постепенно начала снижаться к исходному уровню.

Перфузия того же препарата раствором Рингера, содержащим 50 мМ КФ и почти двукратное количество натрия (213 мМ) приводит к первоначальному уменьшению силы сокращения, сменяющемуся слабым повышением сократительного ответа к концу 15-минутного периода тестирования (рис. 47, В); быстрый рост силы сокращения возник в период отмывания нормальным раствором Рингера, не содержащим КФ. Эти данные показывают, что высокие концентрации натрия не позволяют проявиться положительному инотропному действию КФ, возможно, вследствие влияния натрия на ионный транспорт через клеточную мембрану [12]. Поэтому при изучении действия на силу сокращения КФ в форме натриевой соли целесообразно поддерживать на нормальном уровне концентрацию натрия в растворе Рингера.

Данные, представленные на рис. 47, показывают, что в ходе длительной перфузии нормальным раствором Рингера, не содержащим КФ, сила сокращения мышечной полоски уменьшается со временем. Однако добавление в перфузат разных концентраций КФ во всех случаях увеличивает силу сокращения; максимальная величина, которой достигает сила сокращения на линиях А и Б рис. 47, приблизительно совпадает для разных концентраций КФ. Таким образом, эффект КФ становится более выраженным со временем перфузии нормальным раствором Рингера, которая приводит к снижению внутриклеточной концентрации креатина и КФ [1, 2].

### Влияние креатинфосфата на длительность трансмембранного потенциала действия

Сокращению сердечной мышцы предшествует потенциал действия, в ходе которого развивается зависящий от потенциала кальциевый ток, играющий важную роль в активации сокращения [13—17]. Поэтому представляло интерес выяснить, насколько изменения силы сокращения мышечной полоски под влиянием КФ связаны с изменением электрической активности мышечных волокон. Для этой цели проведены специальные опыты, в которых одновременно регистрировались механическая активность препаратов и трансмембранные потенциалы действия.

На рис. 48 и 49 показаны изменения силы сокращения и потенциала действия под влиянием 20 мМ КФ. Как видно из этих рисунков, вместе с возрастанием силы сокращения под действием КФ наблюдается также значительное увеличение длительности потенциала действия. При последующем отмывании нормальным раствором Рингера происходит одновременное уменьшение как силы сокращения, так и длительности потенциала действия до исходных величин. Таким образом, КФ в концентрации 20 мМ вызывает параллельное изменение как длительности потенциала, так и силы сокращения. Эти данные свидетельствуют о заметном

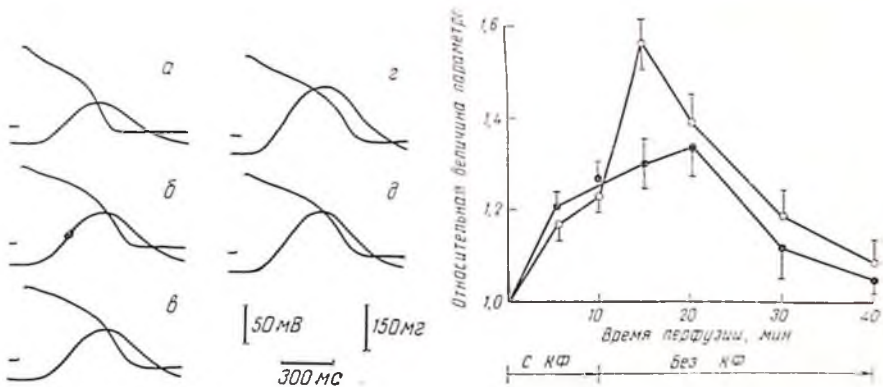


Рис. 48. Влияние 20 мМ КФ на форму трансмембранного потенциала действия и одиночные циклы сокращения полоски миокарда желудочка сердца лягушки.

а — исходные силы сокращения (нижняя кривая) и трансмембранный потенциал действия (верхняя кривая) после 3½ ч перфузии нормальным раствором Рингера, б, в — 5-й, 10-й минуты перфузии раствором Рингера, содержащим 20 мМ КФ; г, д — 5-й и 10-й минуты отмывания нормальным раствором Рингера.

Рис. 49. Влияние 20 мМ КФ на длительность потенциала действия (черные кружочки) и силу сокращения (белые кружочки) полоски миокарда желудочка. Длительность потенциала действия измерена на уровне 90 % реполяризации. По оси ординат — относительные величины параметров, нормированные к их исходным значениям. Исходная длительность потенциала действия составляла 430—480 мс. На графике отложены средние величины и стандартные отклонения по 4—5 опытам. По оси абсцисс отложено время перфузии в минутах.

влиянии КФ на процессы, происходящие на мембране сердечных клеток и связанные с фазой реполяризации потенциала действия.

Повышение концентрации КФ в перфузате до 70 мМ позволило выявить разнонаправленные изменения длительности потенциала действия и силы сокращения сердечной мышцы. Как показано на рис. 50, в начальный период перфузии раствором Рингера, содержащим 70 мМ КФ, отмечено увеличение как длительности потенциала действия, так и силы сокращения полоски миокарда. Однако через 5 мин перфузии КФ сила сокращения уменьшилась, тогда как длительность потенциала действия продолжала возрастать. В период отмывания препарата нормальным раствором Рингера сила сокращения значительно увеличилась, тогда как длительность потенциала действия оставалась неизменной или уменьшалась. Таким образом, в случае высоких концентраций КФ длительность потенциала действия и сила сокращения изменялись в противоположных направлениях: в то время как длительность потенциала только возрастала в присутствии КФ и уменьшалась при последующем его отмывании, характер изменения силы сокращения был более сложным.

С целью сравнения с эффектом высоких концентраций КФ на рис. 50 пунктирной линией показано действие креатина





Рис. 50. Влияние 70 мМ КФ на длительность потенциала действия (черные кружочки) и силу сокращения (белые кружочки) полоски миокарда желудочка. Обозначения те же, что на рис. 49.

(92 мМ) на силу сокращения сердечной мышцы (данные взяты из работы [18]). В отличие от КФ высокие концентрации креатина с самого начала воздействия вызывают быстрое угнетение силы сокращения. Поскольку креатин в высокой концентрации оказывает ингибирующее действие на силу сокращения [2], наблюдаемое в случае введения в перфузат КФ уменьшение силы сокращения после первоначального ее возрастания можно объяснить накоплением внутри клетки креатина в значительной концентрации благодаря его быстрому освобождению из КФ.

### Влияние креатинфосфата на силу сокращения и трансмембранный потенциал действия миокарда желудочка, обработанного цианидом

Как уже отмечалось, сила сокращения миокарда желудочка лягушки наиболее отчетливо регулируется креатином и КФ в тех случаях, когда внутриклеточная концентрация этих веществ снижена путем вымывания в результате длительной перфузии пормальным раствором Рингера [1, 2]. Эти эксперименты привели к заключению, что сила сокращения и длительность потенциала действия зависят от внутриклеточной концентрации КФ, который является основным переносчиком энергии от митохондрий к миофибриллам и внемитохондриальным клеточным мембранам. Из этого заключения следует, что если образование КФ в митохондриях полностью прекращено, в результате чего миокардиальные волокна не сокращаются, то введение в клетки КФ должно восстановить их сократительную способность. Проницаемость поверхностной мембраны миокардиальных волокон лягушки для КФ позволяет повышать его внутриклеточное содержание путем добавления в перфузионный раствор. Справедливость приведенных

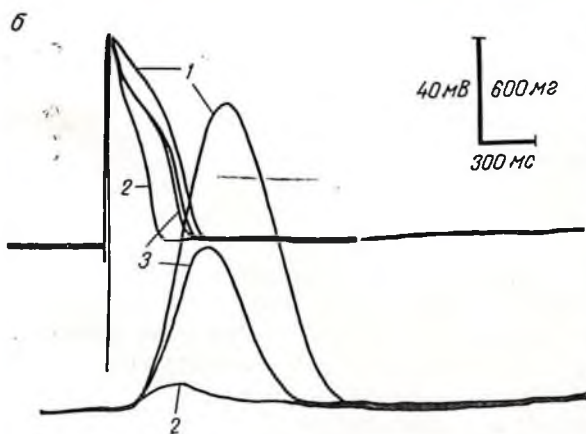
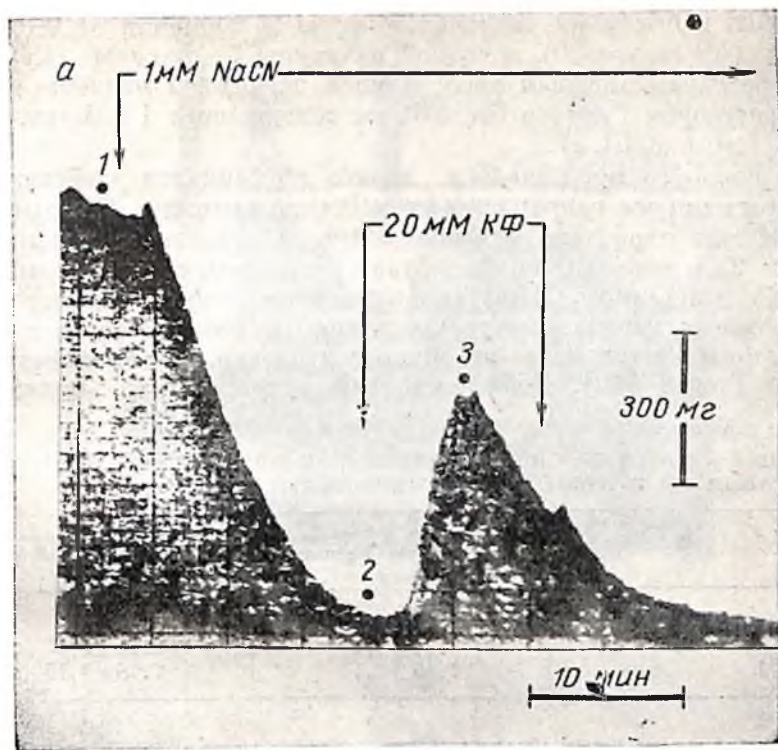


Рис. 51. Влияние КФ на трансмембранный потенциал действия и силу сокращения миокардиальной полоски желудочка, обработанной цианидом натрия. а — непрерывная регистрация силы сокращения; стрелками указаны моменты введения цианида натрия (1 мМ) и КФ (20 мМ); б — регистрация потенциалов действия (верхние кривые) и циклов сокращений (нижние кривые) до введения цианида (кривые 1), через 10 мин перфузии раствором Рингера, содержащим цианид натрия (1 мМ), и через 10 мин после начала перфузии раствором Рингера, содержащим 1 мМ NaCN и 10 мМ КФ.

рассуждений вытекает из результатов эксперимента, представленного на рис. 51, а и в табл. 6. После добавления в перфузионный раствор цианида натрия (1 мМ) сила сокращения быстро уменьшалась в результате торможения окислительного фосфорилирования в митохондриях. Последующее добавление КФ в концентрации 10 мМ на фоне продолжающегося действия цианида

приводило к быстрому увеличению силы сокращения от  $9 \pm 3$  до  $50 \pm 8\%$  ( $m \pm m$ ,  $n=20$ ) исходной величины. Рост силы сокращения может быть прерван последующей перфузией мышечной полоски раствором Рингера без КФ, но содержащим 1 мМ цианида натрия (см. рис. 51, а).

На рис. 51, б представлена запись потенциалов действия в одиночных циклах сокращения до действия цианидов (кривые 1), после 10 мин перфузии раствором Рингера, содержащим цианиды (кривые 2) и после 10 мин перфузии раствором, содержащим КФ (10 мМ) и цианиды. Перфузия мышечной полоски раствором с цианидами вызывала быстрое угнетение не только силы сокращения, но и длительности потенциала действия, что соответствует данным Prasad [19]. Добавление КФ в присутствии цианидов

ТАБЛИЦА 6

ВЛИЯНИЕ 1 мМ NaCN НА СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ КФ И АТФ (ДАНИЕ 5 ЭКСПЕРИМЕНТОВ)

	Нормальный раствор Рингера, 20 мин адаптации; $M \pm m$	Раствор Рингера + 1 мМ NaCN, 20 мин действия; $M \pm m$
Сила сокращения, %	100	$9 \pm 3$
КФ, мМ	$1,1 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,1$
АТФ, мМ	$1,45 \pm 0,15$	$1,25 \pm 0,15$

приводило к явному восстановлению формы потенциала действия (верхние кривые на рис. 51, б). Эти результаты демонстрируют важную роль КФ в регуляции как силы сокращения, так и ионного транспорта, который определяет фазу плато потенциала действия.

### Влияние креатинфосфата на силу сокращения и трансмембранный потенциал действия предсердной мышцы лягушки

Так как все предыдущие эксперименты проведены на миокарде желудочка лягушки, представляло интерес исследовать действие КФ на предсердную ткань, на которой можно сравнить изменения в силе сокращения и трансмембранных потенциалах действия под влиянием КФ с изменениями медленного внутрь направленного кальциевого тока в тех же препаратах. Для опытов этой серии использовали фрагменты предсердий массой 10—15 мг. Полоски ткани предсердий получали от животных, которых в течение нескольких месяцев содержали в холодильнике при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ ; после 5—6 мес внутриклеточное содержание КФ в предсердных волокнах спонтанно снижалось с  $6 \pm 0,7$  до  $1,1 \pm 0,4$  мМ. Такие типодинамические сердца были использованы в описанных ниже экспериментах.

а

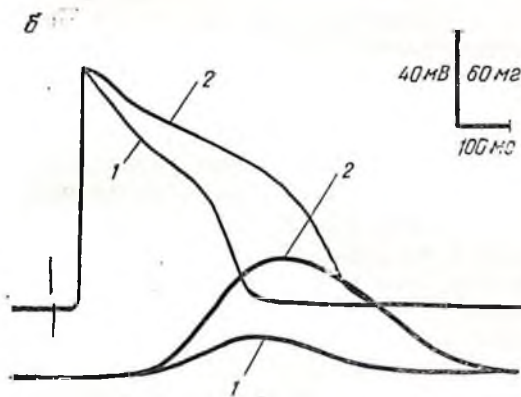
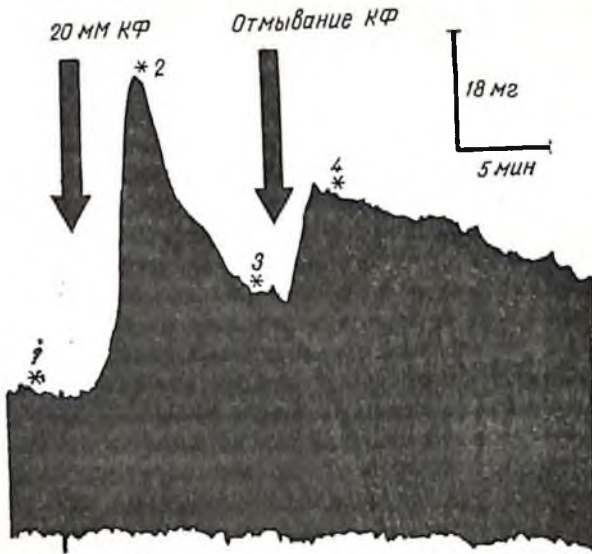
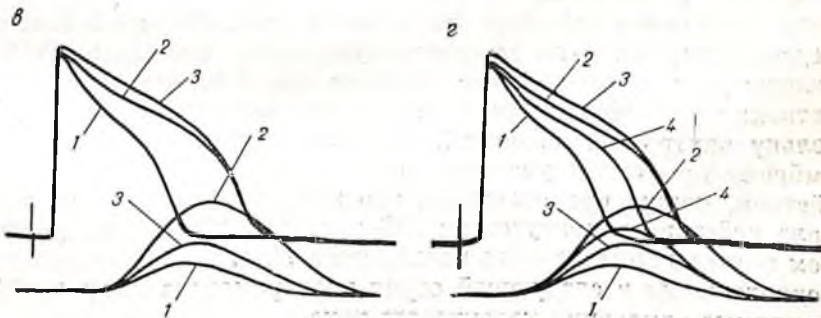


Рис. 52. Влияние КФ (20 мМ) на силу сокращения и трансмембранные потенциалы действия полоски миокарда предсердий лягушки.

а — непрерывная регистрация силы сокращения полоски миокарда предсердий лягушки; стрелками отмечено введение КФ, звездочками отмечены моменты регистрации одиночных циклов сокращения и трансмембранных потенциалов действия на рис. б—г: б—г — трансмембранные потенциалы действия (верхние кривые) и одиночные циклы сокращения (нижние кривые) до введения КФ (кривые 1), через 3 мин после введения КФ (кривые 2), через 9 мин после введения КФ (кривые 3) и через 4 мин отмывания нормальным раствором Рингера.



7\*

На рис. 52, а показано изменение силы сокращения полоски предсердия при перфузии ее раствором Рингера, содержащим 20 мМ КФ. Как видно из этого рисунка, КФ в течение 5 мин вызвал трехкратное увеличение силы сокращения по сравнению с контролем, после чего она спонтанно уменьшилась. Сила сокращения возросла повторно после удаления из перфузата КФ, возможно, вследствие отмывания избытка внутриклеточного креатина. В период перфузии нормальным раствором Рингера сила сокращения снижалась и через 30 мин достигла исходной величины.

На рис. 52, б — г показаны потенциалы действия (верхние кривые) и одиночные циклы сокращения (нижние кривые), полученные до тестирования КФ (регистрации 1), в момент его максимального эффекта (кривые 2) и во время повышения силы сокращения, вызванного перфузией мышечной полоски нормальным раствором Рингера (кривые 4) (моменты регистраций одиночных циклов сокращений и потенциалов действий на рис. 52, б, в, г обозначены звездочками на непрерывной записи сокращения рис. 52, а). Как видно из рис. 52, б, при максимальном возрастании силы сокращения происходило значительное увеличение длительности потенциала действия и повышение уровня плато потенциала действия. В случае спонтанного снижения силы сокращения (нижние кривые на рис. 52, в, 3) в присутствии КФ уровень плато потенциала действия оставался повышенным (верхние кривые на рис. 52, в). При отмывании КФ (и, возможно, избытка внутриклеточного креатина) сила сокращения увеличивалась, но длительность и уровень плато потенциала снижались (видно из сравнения кривых 4 и 3 на рис. 52, г).

Из данных опыта, приведенных на рис. 52, следует, что КФ влияет как на потенциал действия, так и на силу сокращения. Сходное действие КФ получено на полосках миокарда желудочка лягушки (см. выше). Длительность потенциала действия и уровень плато возрастали монотонно в присутствии КФ и уменьшались после его удаления, однако при этом сила сокращения изменялась более сложным образом; спонтанное уменьшение ее при действии КФ, возможно, отражает накопление креатина в районе миофибрилл. Различные изменения силы сокращения и длительности потенциала действия, выявленные при действии КФ как на предсердную, так и на желудочковую ткань, по-видимому, обусловлены двумя различными местами его действия в сердечных клетках: на миофибриллы и на плазматическую мембрану. Поскольку внутрь направленный кальциевый ток через клеточную мембрану принимает участие в формировании плато потенциала действия, можно предположить, что подъем уровня плато потенциала действия в присутствии КФ частично обусловлен увеличением внутрь направленного кальциевого тока. Для проверки этого предположения в следующей серии экспериментов были проведены прямые измерения кальциевого тока.

## Влияние креатинфосфата на медленный внутри направленный кальцевый ток

Эксперименты, представленные в этом разделе, проводились в такой последовательности: после того как предсердная трабекула была обработана тетродотоксином и был заблокирован быстрый входящий натриевый ток, на каждом препарате находили величину мембранного потенциала, соответствующую максимальному медленному внутри направленному току, который регистрировали в качестве исходного тока. После этого в тестирующий отсек камеры вводили раствор Рингера, содержащий КФ (20 мМ), и повторно регистрировали кальцевый ток. Кривая 1 на рис. 53, а является регистрацией медленного внутри направленного тока до действия КФ. Через 1½ мин (кривая 2) и 2½ мин (кривая 3) перфузии раствором Рингера, содержащим 20 мМ КФ, максимальная величина медленного внутри направленного кальцевого тока значительно возросла. Сходные результаты получены в 8 аналогичных экспериментах, в которых медленный ток под действием КФ увеличивался более чем в 3 раза по сравнению с исходной величиной.

Из рис. 53, б видно, что увеличенный КФ медленный кальцевый ток продолжает возрастать при повышении внеклеточной концентрации кальция. Чувствительность медленного входящего тока к внеклеточной концентрации кальция является характерной особенностью именно кальцевого тока.

Необходимо подчеркнуть, что в присутствии КФ наблюдается постепенная деполяризация клеточной мембраны (5—7 мВ за первые 3—5 мин; см. рис. 53). Такая деполяризация может быть обусловлена уменьшением выходящих калиевых токов. Поэтому наши измерения кальцевого тока были произведены лишь в течение первых 3—5 мин действия КФ.

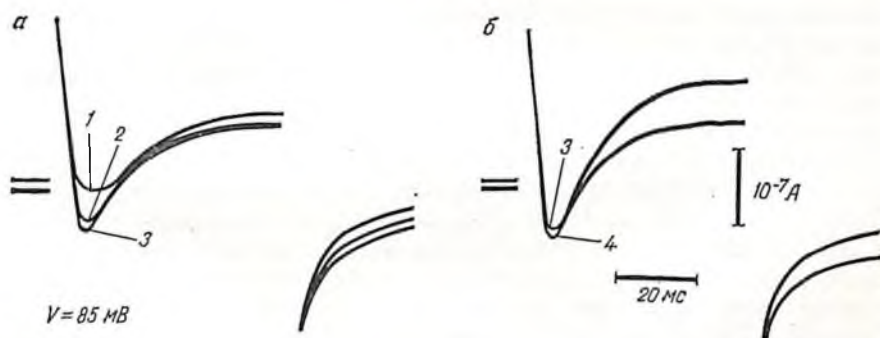


Рис. 53. Влияние КФ на медленный ток, направленный внутрь предсердной трабекулы лягушки.

а — медленный, внутри направленный ток до введения КФ, 2,3 — соответственно через 1½ мин и 2½ мин после начала перфузии раствором Рингера, содержащим 20 мМ КФ; б — 3 — то же, что 3 на рис. а; 4 — через 2½ мин перфузии раствором Рингера, содержащим 20 мМ КФ и 5,4 мМ кальция.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальные данные, полученные в этой работе, согласуются с заключением, сделанным ранее [1, 2], что КФ способен контролировать сокращение сердечной мышцы. Кроме того, прямо показана регуляторная роль КФ в процессе переноса кальция через поверхностную мембрану сердечных клеток в миоплазму.

Полученные недавно биохимические и физиологические данные позволили нам заключить, что КФ осуществляет метаболический контроль над сокращением путем воздействий на ряд процессов, играющих важную роль в регуляции сократительной функции. Центральная роль КФ обусловлена существованием креатинфосфатного пути транспорта энергии [6, 7].

Идея о том, что КФ осуществляет перенос энергии от митохондрий к местам ее использования в мышечной клетке, возникла на основании исследований Bessman [20], Gudbjarnason и соавт. [21] и других авторов [22, 23]. Эта концепция получила экспериментальное подтверждение в работах, посвященных синтезу КФ в митохондриях сердца [24, 25], в исследованиях локализации и функциональной роли изоферментов КФК в клетках миокарда [11, 26, 27], а также в опытах *in vivo* при изучении действия креатина на энергетическое состояние и силу сокращения миокарда [1, 2, 11]. Изоферменты КФК (ММ) обнаружены во всех клеточных структурах, которые активно используют энергию, — в миофибриллах, мембране саркоплазматического ретикулума и в плазматической клеточной мембране [2, 17, 26—28]. Эти изоферменты КФК обеспечивают эффективное использование КФ для синтеза АТФ из АДФ, образующейся в результате АТФ-азных реакций. Так как КФ контролирует скорость регенерации АТФ благодаря КФК-реакциям, они играют центральную роль, обеспечивая действие КФ внутри клетки. В обеспечении сокращения через креатинфосфатный путь миофибриллярная КФК играет наиболее существенную роль. Таким образом, несмотря на тот факт, что молекулярный механизм сокращения включает гидролиз АТФ благодаря АТФ-азной реакции миозина [29], мышечное сокращение всегда сопровождается снижением уровня КФ при постоянном уровне АТФ [30]. Использование АТФ в мышечном сокращении наблюдалось только после ингибирования КФК [31]. В 1954 г. Ренгу [32] показал, что в присутствии КФК и КФ следовые количества АДФ (3 мкМ) вызывают сокращение выделенных пассивных миофибрилл; такую степень сокращения не удалось получить при добавлении к миофибриллам более чем 60 мкМ АТФ. Прочная связь миозина с КФК обнаружена *in vitro* [33—36]. Показано, что в скелетной мышце КФК является интегральной частью структур М-линии саркомера [35]. Важная роль приписывается также исследованиями, в которых показано, что после торможения цианидами окислительного фосфорилирования в ми-

тоохондриях падает внутриклеточное содержание КФ [3] и уменьшается сила сокращения (см. табл. 6), при этом, однако, введение КФ может поддерживать сокращение сердечной мышцы на высоком уровне (см. рис. 51, а).

Результаты, полученные в этой работе, так же как и ранее опубликованные данные [1, 2], показали, что, кроме важной роли в энергообеспечении сократительного аппарата, КФ принимает участие в регуляции входа ионов  $Ca$  в миоплазму. Влияние КФ на медленный внутрь направленный ток было продемонстрировано в прямых опытах (см. рис. 53). Известно, что кальциевый ток является важным компонентом электромеханического сопряжения в сердце [13, 17, 37] и что он зависит от метаболического состояния клетки [37—40]. Sperelakis и Schneider [40] высказали предположение, что белок медленного кальциевого канала поверхностной мембраны должен быть фосфорилирован с использованием АТФ в результате зависимой от цАМФ протеникиназной реакции; фосфорилирование протенина необходимо для поддержания канала в активном состоянии, при котором потенциал на мембране способен управлять проницаемостью ионов  $Ca$  [18, 39]. Рассмотренная гипотеза возникла на основании исследований действия катехоламинов [41—43]. В этом случае можно предполагать, что увеличение входа  $Ca$  через клеточную мембрану обусловлено активацией аденилатциклазы, которая, повышая содержание цАМФ, активирует зависимую от нее протеникиназу [41—43]. Таким образом, в присутствии катехоламинов возникают новые медленные каналы. Идея о формировании их получила дальнейшее подтверждение в работах Reuter и Scholtz [18, 39]. Детальный анализ медленного входящего тока под влиянием катехоламинов показал, что при их действии потенциал реверсии тока не изменяется, так же как не меняется ионная селективность медленных каналов.

На основании данных, полученных в настоящем исследовании, можно предполагать, что зависимая от цАМФ протеникиназа связана с КФК, которая локализована на плазматической мембране сердечных клеток [11, 28]. Посредством этой КФК система протеникиназы может быть связана через КФ с внутриклеточными метаболическими реакциями. На рис. 54 схематически показана возможная связь между протеникиназой и КФК на клеточной мембране. В соответствии с этой схемой КФК регенерирует АТФ после протеникиназной реакции и, таким образом, влияние КФ на медленный внутрь направленный ток объясняется его способностью определять скорость регенерации АТФ. В результате внутриклеточная концентрация КФ может влиять на количество медленных катионных каналов, находящихся в активном состоянии. Увеличение медленного внутрь направленного кальциевого тока вносит вклад в увеличение длительности потенциала действия в присутствии КФ. Однако эта длительность определяется не только кальциевым током, но и другими ионны-



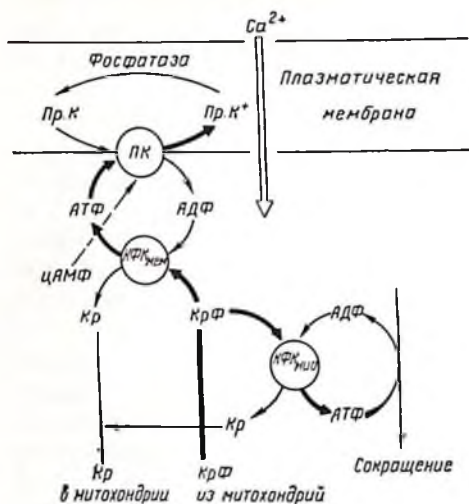


Рис. 54. Схема возможной взаимосвязи между фосфорилированием белков медленного катионного канала и КФК-реакциями в сердечных клетках.

КФК<sub>memb</sub> — креатинфосфокиназа мембраны; КФК<sub>myo</sub> — креатинфосфокиназа миофибрилл; цАМФ — циклический аденозинмонофосфат; ПрК — нефосфорилированный белок канала; ПрК\* — фосфорилированный белок канала. Стрелка — движение Ca<sup>2+</sup> по медленному каналу.

ми токами [15, 44], которые также могут быть изменены КФ. Для дальнейших исследований большой интерес представляют вопросы о возможном влиянии КФ на процессы электронейтрального входа Ca в клетки [12] и на энергозависимый выход Ca из клеток [45].

Важное заключение, которое может быть сделано на основании проведенного исследования, состоит в том, что снижение содержания КФ при аноксии (или ишемии) приводит не только к уменьшению энергоснабжения сократительного аппарата клетки, но и к уменьшению входа Ca через поверхностную мембрану в клетку. Последнее помогает объяснить, почему миофибриллы сердечной мышцы находятся в расслабленном состоянии и не образуют ригорных комплексов, когда сокращение прекращено вследствие дефицита энергии при аноксии [46].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenshtraukh L. V., Saks V. A., Undrovinas A. I. et al. Mechanism of energy transport in cardiac cells. II. Regulation of myocardial contractility via influence on intracellular energy transport.—In: Proceedings of the 2nd USA-USSR Joint Symposium on Myocardial Metabolism, Sochi, May 28—30, 1975 /DHEW Publication No. (NIH) 77—924, pp. 163—174.
2. Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Undrovinas A. I. et al. Studies of energy transport in heart cells. Intracellular creatine content as a regulatory factor of frog heart energetics and force of contraction.—Biochem. Med., 1976, 16, 21—36.
3. Vassort G., Venturga-Clapier R. Significance of creatine phosphate on the hypodynamic frog heart.—J. Physiol. (London), 1977, 269, 86 p.—87 p.
4. Champan R. A., Niedergecke R. Effect of calcium on the contraction of the hypodynamic frog heart.—J. Physiol. (London), 1970, 211, 389—421.
5. Clark A. J. The action of ions and lipids upon the frogs heart.—J. Physiol. (London), 1913, 47, 66—107.

6. Saks V. A., Rosenshtraukh L. V. Current problems of cardiac cells energetics.—Ther. Arch. (USSR). 1977, 49, 120—132.
7. Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Smirnov V. N., Chazov E. I. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism.—Can. J. Physiol. Pharmacol., 1979, 56, 691—706.
8. Rosenshtraukh L. V., Yuravichus I. A., Undrovinas A. I. et al. Effect of ethmozin on the contractile force, action potential and sodium current in frog auricular muscle. Proceedings of USA-USSR First joint Symposium on sudden death, Jalta, USSR, October 3—5, 1977, USA Department of HEW PHS, NIH, DHEW Publication number (NIH) 78, 1978, p. 291—308.
9. Kish B. Electron microscopy of frog's heart.—Exp. Med. Surg., 1961, 19, 104—116.
10. Staley N. A., Benson E. S. The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanism of excitation-contraction coupling.—J. Cell. Biol., 1968, 38, 99—114.
11. Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Sharov V. G. et al. Role of the creatine phosphokinase reactions in the energy metabolism of cardiac cells. Proceedings of USSR-USA third joint symposium on myocardial metabolism, Williamsburg, Virginia, May 9—11, 1977, USA Department of HEW, PHS, NIH, DEW Publication Number (NIH), 1978, 78, 289—321.
12. Langer G. A., Frank J. S., Brady A. J. The myocardium.—Int. Rev. Physiol., 1976, 9, 191—237.
13. Beeler G. W., Reuter H. J. The relation between membrane potential, membrane currents and activation on contraction in ventricular myocardial fibers.—J. Physiol. (London), 1970, 207, 211—229.
14. Fozzard H. A., Gibbon W. B. Action potential and contraction of heart muscle.—Am. J. Cardiol., 1973, 31, 182—192.
15. Coraboeuf E. Cardiac electrophysiology.—Cardiovasc. Res. (Suppl. 1), 1971, p. 55—63.
16. Morad M., Goldman Y. Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension.—Progr. Biophys. mol. Biol., 1973, 27, 257—313.
17. Beeler G. W., Reuter H. J. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibers.—J. Physiol. (London), 1970, 207, 191—209.
18. Reuter H., Scholtz H. A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian muscle.—J. Physiol. (London), 1977, 264, 17—48.
19. Prasad K. Cardiac metabolism and electromechanics of human heart.—In: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. /Eds. P. E. Roy a. G. Rona. Baltimore: University Park Press, 1975, V. 10, p. 119—137.
20. Bessman S. A molecular basis for the mechanism of insulin action.—Am. J. Med., 1966, 40, 740—749.
21. Gudbjarnason S., Mathes P., Ravens K. G. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle.—J. Med. cell. Cardiol., 1970, 1, 325—339.
22. Gercken G., Schlette U. Metabolic status of heart in acute insufficiency due to 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene.—Experientia, 1968, 24, 17—19.
23. Nagle S. Die Bedeutung von Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat im Herzmuskel.—Klin. Wschr., 1970, 48, 332—341.
24. Jacobus W. E., Lehninger A. L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport.—J. biol. Chem., 1973, 248, 4803—4810.
25. Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E. et al. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of  $Mg^{2+}$  ions.—Eur. J. Biochem., 1975, 273—290.
26. Levitsky D. O., Levchenko T. S., Saks V. A. et al. The role of creatine phosphokinase in supplying energy for the calcium pump system of heart sarcoplasmic reticulum.—Membrane Biochem. 1978, 2, 81—96.

27. Saks V. A., Lipina N. V., Sharov V. G. et al. The localization of the MM isoenzyme of creatine phosphokinase on the surface membrane of myocardial cells and its functional coupling to ouabain-inhibited ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATPase.—*Biochim. biophys. Acta.* 1977, 5, 550—558.
28. Sharov V. G., Saks V. A., Smirnov V. N., Chazov E. I. An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells.—*Biochim. biophys. Acta.* 1977, 468, 495—501.
29. Taylor E. W. Chemistry of muscle contraction.—*Ann. Rev. Biochem.*, 1972, 41, 577—616.
30. Mommaerts W. F. H. M. Energetics of muscular contraction.—*Physiol. Rev.*, 1979, 49, 427—508.
31. Cain D. F., Davies R. E. Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle.—*Biochem. biophys. Res. Comm.*, 1962, 8, 361—366.
32. Perry S. V. Creatine phosphokinase and the enzymic and contractile properties of the isolated myofibrils.—*Biochem. J.*, 1954, 57, 427—431.
33. Botts J., Stone M., J. Kinetics of coupled enzymes: creatine kinase and myosin A.—*Biochemistry*, 1968, 7, 2688—2696.
34. Mani R. S., Kay C. M. Physicochemical studies on the creatine kinase M-line protein and its interaction with myosin fragments.—*Biochim. biophys. Acta.* 1976, 453, 391—399.
35. Walliman T., Turner D. C., Eppenberger H. M. Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle.—*J. cell. Biol.*, 1977, 75, 297—317.
36. Yagi K., Mase R. Coupled reaction of creatine kinase and myosin A adenosine triphosphatase.—*J. biol. Chem.*, 1962, 237, 397—403.
37. Carmeliet E. Cardiac transmembrane potentials and metabolism.—*Circulat. Res.*, 1978, 42, 577—587.
38. Luttgau H. C. New trends in membrane physiology of nerve and muscle fibers.—*J. Comp. Physiol.*, 1977, 120, 51—70.
39. Reuter H., Scholz H. The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline.—*J. Physiol. (London)*, 1977, 264, 49—62.
40. Sperelakis N., Schneider J. A. A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell.—*Am. J. Cardiol.*, 1976, 37, 1079—1085.
41. T sien R. W., Giles W. R., Grcengard P. Cyclic AMP mediates the action of adrenaline on the potential plateau of cardiac Purkinje fibers.—*Nature, New Biol.*, 1972, 240, 181—183.
42. T sien R. W. Mode of action of chronotropic agents in cardiac Purkinje fibers. Does epinephrine act by directly modifying the external surface charge?—*J. gen. Physiol.*, 1974, 64, 320—342.
43. Williamson J. R., Schaffer S. Epinephrine, cyclic AMP, calcium and myocardial contractility.—In: *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism* /Eds. P. G. Roy, N. S. Dhalla. Baltimore, University Park Press. 1976, V. 9, p. 205—223.
44. Noble D. *The Initiation of the Heart Beat.*—Clarendon Press, Oxford, 1975.
45. J undt H., Reuter H. Is sodium-activated calcium efflux from mammalian cardiac muscle dependent on metabolic energy?—*J. Physiol. (London)*, 1977, 266, 78—79.
46. Kubler W., Katz A. M. Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart: possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation.—*Am. J. Cardiol.*, 1977, 40, 467—471.

## О ВОЗМОЖНОСТИ УЧАСТИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

С. И. ЛЫЗЛОВА, В. Е. СТЕФАНОВ, Н. ТААМЕ (СССР)

Накапливается все больше данных о том, что креатинкиназа (АТФ : креатинфосфаттрансфераза; 2.7.3.2) — фермент, как считалось, ответственный исключительно за поддержание постоянного уровня АТФ в мышечной и нервной тканях, в действительности может играть более универсальную роль. Стало известно, что и креатинкиназа и ее субстраты широко распространены в тканях и локализованы в различных субклеточных структурах. Появились также указания, что субстраты креатинкиназной реакции участвуют в регуляции активного ряда ферментов и в то же время различные метаболиты оказывают влияние на активность креатинкиназы. В некоторых работах приводятся доказательства в пользу аллостерического характера креатинкиназы. В настоящей статье рассматриваются данные, свидетельствующие о широкой вовлеченности креатинкиназной реакции в процессы клеточного метаболизма и таким образом о значительной роли, которую может играть креатинкиназа в регуляции этих процессов.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ КРЕАТИНКИНАЗЫ В ТКАНЯХ И СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ

Подробные сведения по этому вопросу можно найти в ряде работ [1, 2 и др.]. Обращает на себя внимание факт обнаружения креатинкиназы в лейкоцитах [3]. Представляется наиболее вероятным, что основная физиологическая функция креатинкиназы в этих клетках сводится к обслуживанию определенных стадий фагоцитоза. Вопросы, касающиеся физиологических функций креатинкиназной системы, возникают также в результате обнаружения всех компонентов этой системы в жировой ткани [4]. Особенно высок уровень креатинкиназы и ее субстратов в бурой жировой ткани, где он сопоставим с уровнем этих веществ в сердце и нервной ткани и где содержится большое количество митохондрий. Следует также отметить, что креатинкиназа находится в мембранах синапсом и синаптических везикулах [5].

Недавно было показано существование креатинкиназы в ядрах сердечной и скелетных мышц в местах локализации хроматина [6]. Функция ядерного фермента пока еще не исследована, но, очевидно, определяется его локализацией и может состоять в обеспечении химической энергией внутриядерных процессов. Можно также предположить, что креатинкиназная система влияет и на некоторые этапы биосинтеза белка. Косвенным указанием на такую возможность служат данные [7] об эффективном испол-

зовании регенерируемого в креатинкиназной реакции АТФ для белкового синтеза *in vitro* и еще в большей степени данные опосредованном стимулировании синтеза ГТФ, необходимого для инициации синтеза белка при увеличении скорости продукции креатина [8].

#### УЧАСТИЕ ГУАНИДИНОВЫХ СУБСТРАТОВ КРЕАТИНКИНАЗНОЙ РЕАКЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ РЯДА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ

Креатинфосфат (КФ) и креатин представляют собой те субстраты креатинкиназной реакции, содержание которых наиболее резко меняется при мышечной деятельности. Важной отличительной чертой характеризуемого регуляторного механизма является то, что в мышечной клетке креатин и КФ не являются субстратом никакой другой реакции, кроме креатинкиназной. Таким образом, в принципе они могут функционировать как не претерпевающие искажений сигналы, координирующие процессы образования макроэргических соединений, переводя их в резервную форму, и последующей мобилизации в местах утилизации химической энергии. Отмеченных преимуществ лишен АДФ, осуществляющий контроль дыхания в клетках печени и почек, поскольку в мышце уровень этого вещества определяется также присутствием высокоактивной аденилаткиназы. Эвристические соображения в пользу регуляторной роли гуанидинового субстрата креатинкиназы находят подтверждение и в экспериментах [8—11]. Показано, что КФ ингибирует ферменты гликолиза: фосфофруктокиназу [12], пируваткиназу [13], 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназу [14]; на фруктозо-1,6-дифосфатазу оказывает активирующее действие [15]. Креатин, а также образующийся при распаде КФ неорганический фосфат необходимы для активации гликолиза, митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования [8, 16]. В опытах с очищенным препаратом креатинкиназы показано, что креатин является активатором креатинкиназной реакции [10].

Ключевую роль в регуляции энергоснабжения работающей мышцы и связанных с ним процессов обеспечивает высокоэффективный механизм, основанный на взаимодействии двух креатинкиназных систем. В мышечной клетке по крайней мере существуют два морфологически разобщенных фермента: цитоплазматическая и митохондриальная креатинкиназы. Вследствие пространственной разобщенности оба фермента, катализируя реакции, протекающие в противоположных направлениях, могут взаимодействовать друг с другом. Действительно, существует прямая связь между интенсивностью продукции креатина в реакции, катализируемой цитоплазматическим ферментом, и интенсивностью его фосфорилирования в реакции, протекающей в митохондриях [9].

О физиологическом значении такой регуляции свидетельствует тот факт, что при ишемии наблюдается пониженный уровень КФ при практически неизменном содержании АТФ [17]. Таким образом, совокупность данных, полученных различными исследователями в экспериментах на клеточном и органичном уровнях, а также на очищенном препарате фермента, позволяет предположить, что именно креатин является эффектором, контролирующим продукцию АТФ и КФ в митохондриях и цитоплазме сердечной и скелетных мышц. В свою очередь высокая эффективность креатинкиназной системы митохондрий обусловлена как значительным содержанием фермента, так и движущей силой, обеспечиваемой функционированием транслоказы [18]. Следовательно, имеются все основания полагать, что «традиционная» функция фермента, состоящая в обеспечении АТФ работающей мышцы, связана с глобальным участием субстратов креатинкиназной реакции в системах обратных связей, контролирующих гликолиз и окислительное фосфорилирование.

#### **ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ГЛИКОЛИЗА И ПИРОФОСФАТА НА АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ**

Известно, что скорость креатинкиназной реакции регулируется субстратами; определенную роль может играть и локальное изменение рН, происходящее, например, при накоплении лактата в работающей мышце. Однако особый интерес представляет возможность модуляции активности фермента метаболитами, отличающимися от субстратов катализируемой им реакции. Такая возможность обычно обусловлена наличием в молекуле фермента аллостерического центра для связывания регуляторного лиганда, что за редким исключением [19] коррелирует с субъединичным строением белка. В ферменте, обладающем четвертичной структурой, заложена способность к гомотропным и гетеротропным взаимодействиям центров связывания лигандов, а такие взаимодействия существенно повышают регуляторный потенциал фермента.

Креатинкиназа, выделенная из ряда источников, имеет субъединичное (димерное) строение. Однако межсубъединичные взаимодействия маскированы в кинетике реакции, протекающей при оптимальных рН и насыщающих концентрациях фиксируемого субстрата. В значительной мере из-за отсутствия каких-либо отклонений в кинетике реакции от михаэлисовой вопрос о возможной аллостерической природе креатинкиназы долгое время не возникал [20]. Пересмотру сложившихся представлений способствовали эксперименты, в которых удалось выявить взаимодействия субъединиц фермента. Так, для креатинкиназы из скелетных мышц кролика была показана отрицательная кооперативность при связывании АДФ в присутствии креатина и нитрата, формирующих конфигурацию переходного состояния [21]. Для фермента

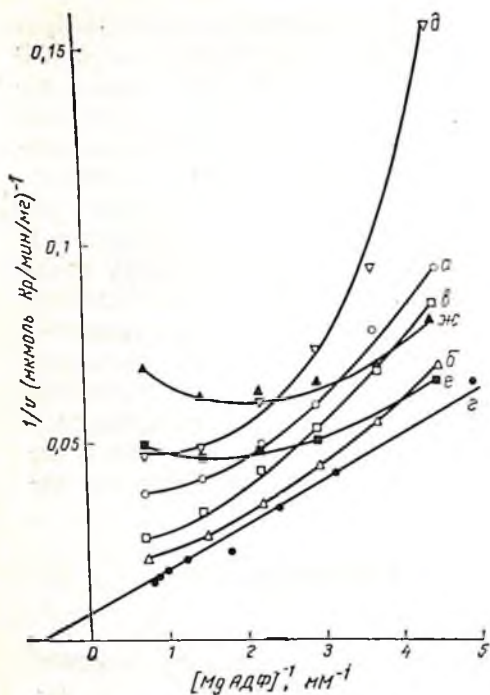


Рис. 55. Влияние рН на форму графиков Лайнуивера—Бэрка для КФК-реакции; рН имеет следующие значения: а—7; б—6,75; в—6,5; г—6,25; д—6,0; е—7,5; ж—8,0. Концентрации КФ насыщающие.

фиксированного субстрата и становится гиперболической при его насыщающих концентрациях (рис. 56). При проведении измерений в широком диапазоне концентраций аномалии были отмечены и в кинетике реакции, катализируемой креатинкиназой из скелетных мышц человека [24]. Авторы этой работы рассматривают полученные ими результаты как указание на взаимодействие центров связывания субстратов.

Наличие в молекуле креатинкиназы внутримолекулярного регуляторного механизма, связанного с взаимодействием субъединиц, ставит вопрос о метаболитах, которые могут функционировать как сигналы, чье действие на креатинкиназную систему опосредуется таким механизмом. Следует, однако, признать, что данные об эффекторах креатинкиназной реакции весьма ограничены и отчасти противоречивы. Описано ингибирующее действие на креатинкиназу скелетных мышц кролика интермедиагов гликолиза: глюкозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-дифосфата и фосфоенолпирувата [25], а также пирувата и лактата [26]. Однако однозначную физиологическую трактовку этих интересных дан-

из некоторых других источников предположение о взаимодействии субъединиц может быть сделано на основании анализа процесса блокирования тиоловых групп и сопровождающей его инактивации фермента [22, 23]. Нам удалось подобным образом выявить взаимодействия субъединиц креатинкиназы из белых мышц сома. Для фермента из этого же источника мы показали значительное отклонение субстратных зависимостей скорости креатинкиназной реакции от гиперболической при неоптимальных значениях рН (рис. 55). Нами также показано, что S-образные кривые описывают зависимость скорости реакции, катализируемой креатинкиназой из мышц щуки, от концентрации варьированного субстрата при низких концентрациях фиксированного субстрата. Зависимость нормализуется с увеличением концентрации

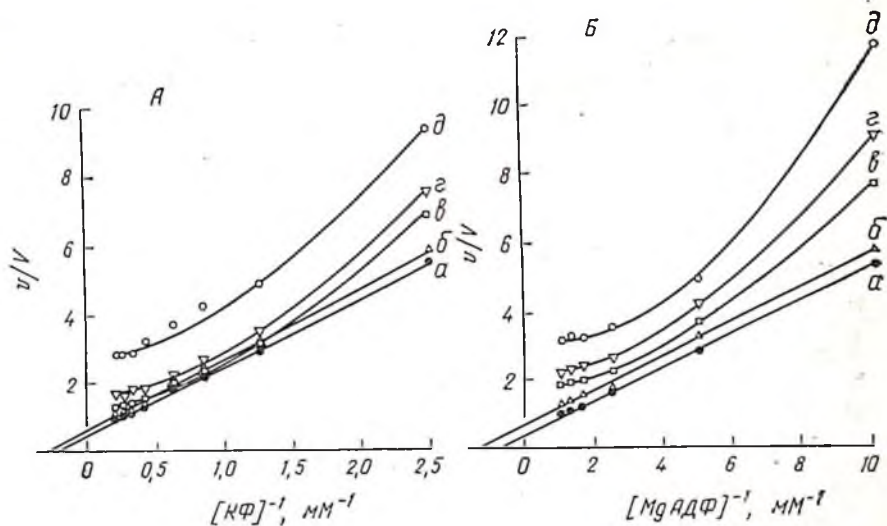


Рис. 56. Влияние концентраций фиксируемого субстрата на форму графиков Лайнуивера — Берка.

А — фиксируемые концентрации МгАДФ имеют следующие значения: а — 1 мМ, б — 0,8 мМ, в — 0,6 мМ, г — 0,4 мМ, д — 0,2 мМ; Б — фиксируемые концентрации креатинфосфата имеют следующие значения: а — 4 мМ, б — 2,4 мМ, в — 1,6 мМ, г — 1,2 мМ, д — 0,8 мМ.

ных затрудняет возможность неспецифического влияния фосфорных эфиров, обусловленная их анионной природой. Гликолитический потенциал белых мышц рыб значительно выше, чем скелетных мышц теплокровных животных; в нормальных условиях анаэробный гликолиз является для них важнейшим источником химической энергии. Вместе с тем изменение внешних условий, например понижение температуры и связанное с ним увеличение доступности кислорода, может интенсифицировать процессы расщепления жирных кислот. Учитывая эти обстоятельства, мы также предприняли исследование влияния интермедиатов гликолиза глюкозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-дифосфата, фосфоенолпирувата и пирофосфата на каталитические свойства креатинкиназы белых мышц сома.

Особенности клеточного метаболизма белых мышц рыб могут воспроизводить определенные черты метаболизма других клеток, а также моделировать некоторые патологические ситуации. Поэтому мы полагаем, что сведения о регуляторных свойствах исследованного нами фермента должны представлять не только специальный, но и более общий интерес.

Нами показано, что глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат и фосфоенолпируват неконкурентно ингибируют креатинкиназу белых мышц сома, причем насыщающие концентрации первых двух метаболитов вызывают лишь частичное, не превышающее 50% ингибирование (рис. 57). Зависимости скорости реакции от



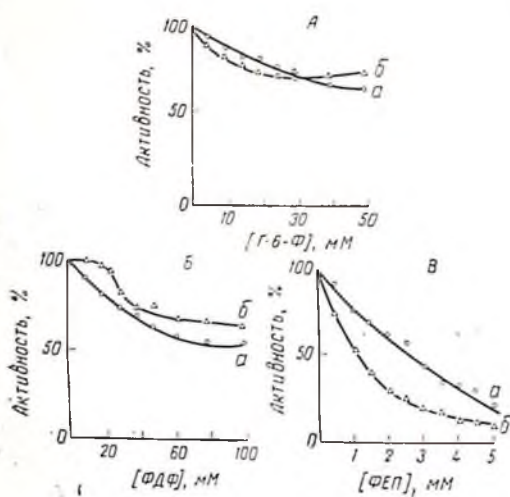


Рис. 57. Ингибирующее влияние гликолитических интермедиагов Г-6-Ф (А), ФДФ (Б), ФЕП (В) на креатинкиназную активность свежего (а) и старого (б) препаратов фермента.

концентрации субстратов, не обнаруживающие никаких отклонений от михаэлисовых в отсутствие перечисленных веществ, претерпевали значительную трансформацию в их присутствии, проявляющуюся в сильно выраженной S-образности (рис. 58—60). Следует, однако, признать, что дефицит данных о содержании гликолитических интермедиагов в белых мышцах рыб (мы располагаем информацией только о содержании фруктозо-1,6-дифосфата и глюкозо-6-фосфата в белых мышцах *Gadus marhua*, составляющем соответственно 250 и 59,2 ммоль на 100 г ткани [27]) не позволяет оценить истинное физиологическое значение наблюдаемых эффектов. Отмеченная трудность усугубляется необходи-

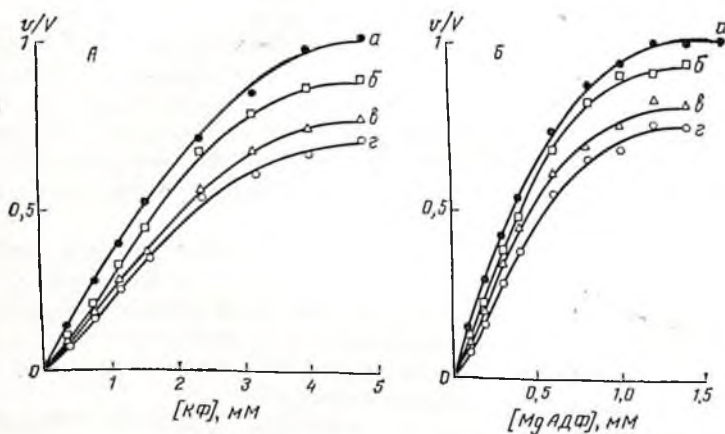


Рис. 58. Влияние Г-6-Ф на субстратную зависимость скорости креатинкиназной реакции при насыщающей концентрации MgADP (А) и КФ (Б). Концентрации Г-6-Ф имеют следующие значения: а — 0 мМ, б — 12,5 мМ, в — 25 мМ, г — 37,5 мМ.

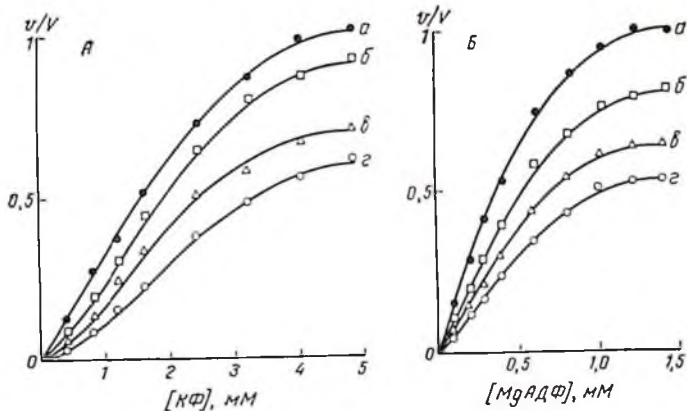


Рис. 59. Влияние ФДФ на субстратную зависимость скорости креатинкиназной реакции при насыщающей концентрации MgADP (А) и креатинфосфата (Б). Концентрации ФДФ имеют следующие значения: а — 0 мМ, б — 25 мМ, в — 50 мМ, г — 75 мМ.

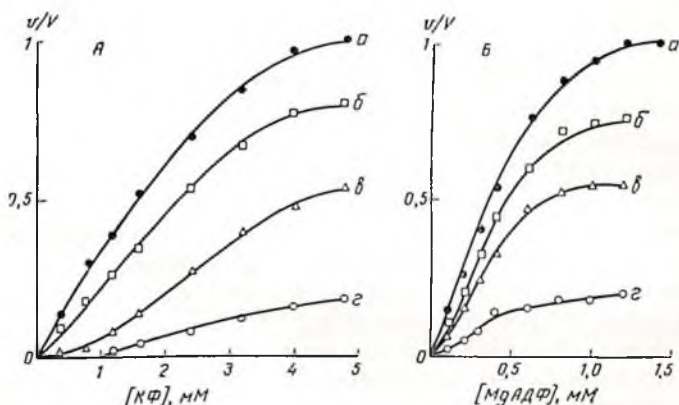


Рис. 60. Влияние ФЕП на субстратную зависимость скорости креатинкиназной реакции при насыщающей концентрации MgADP (А) и КФ (Б). Концентрации ФЕП имеют следующие значения: а — 0 мМ, б — 1 мМ, в — 2,5 мМ, г — 5 мМ.

мостью принимать во внимание эффективные (локальные) концентрации, которые могут значительно отличаться от усредненных. Все же можно полагать, что потенциальная способность креатинкиназной системы специфическим образом отвечать именно на «гликолитические» сигналы, а не интегральный показатель «энергетического статуса», каким является «аденилатный энергетический заряд», имеет большое значение для многих видов рыб. Главным образом это относится к тем из них, которых можно считать факультативными анаэробами. Некоторые из них, напри-

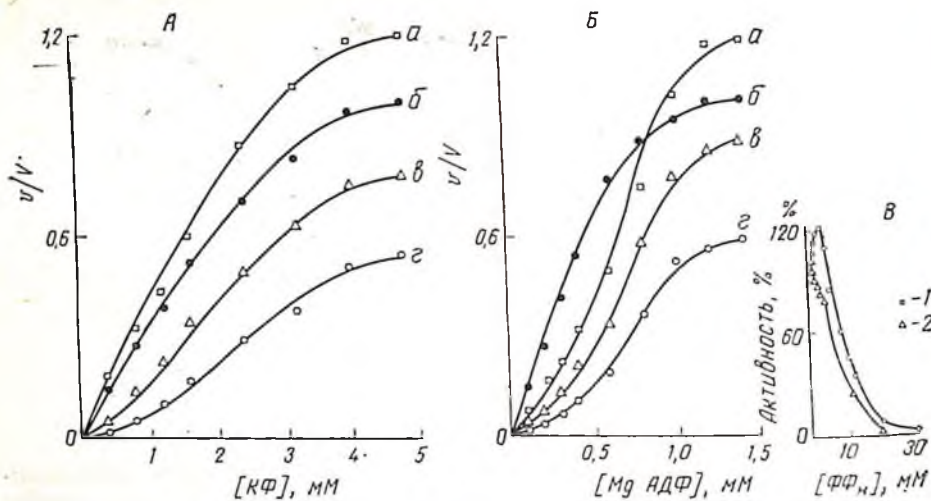


Рис. 61. Зависимость скорости креатинкиназной реакции от концентрации КФ (А) и концентрации MgАДФ (Б) при различных концентрациях пиррофосфата: а — 2,5 мМ, б — 0 мМ, в — 5 мМ, г — 10 мМ; (В) — активность свежего (1) и старого препарата (2) креатинкиназы в присутствии пиррофосфата.

мер карп, обладают такой системой метаболической регуляции (на уровне ЛДГ реакции), которая позволяет избежать накопления лактата в анаэробических условиях в течение 2—3 мес [28]. Очевидно, при переключении с аэробноза на анаэробноз и обратно функционирование гликолитической системы таких животных радикально меняется; резкие изменения претерпевает интенсивность потока по гликолитическому пути. С этим могут быть связаны важные изменения в концентрациях гликолитических интермедиатов, способность которых модулировать каталитические характеристики креатинкиназы могут обеспечивать согласованную работу креатинкиназной и гликолитической систем в изменившихся условиях.

Действие пиррофосфата на активность исследованного нами фермента носило двухфазный характер (рис. 61): активирование при малых концентрациях и ингибирование при высоких. Ингибирование, вызываемое пиррофосфатом, было полным; можно предположить, что оно обусловлено связыванием в активном центре и носит конкурентный характер. Наоборот, активирующий эффект этого метаболита, наблюдаемый при физиологических концентрациях, скорее всего связан с взаимодействием в аллостерическом центре. Такое предположение подтверждается, в частности, характером десенсибилизации фермента к действию пиррофосфата в результате хранения препарата фермента. При незначительном изменении активности фермент полностью утрачивал способность активироваться пиррофосфатом; при этом ингибирующее действие

его оставалось практически неизменным. Профиль зависимости креатинкиназной активности свежего препарата от концентрации пирофосфата (см. рис. 61), характеризующийся острым пиком в области низких концентраций, позволяет предположить, что пирофосфатная регуляция креатинкиназы имеет определенное физиологическое значение. Так, она может быть механизмом, согласующим расщепление жирных кислот при увеличенной доступности кислорода с интенсификацией депонирования освобождаемой энергии в форме КФ. Известно существование связи между гликолизом и окислением жирных кислот. Гликолиз ингибируется окислением жирных кислот [29], а КФ, как указывалось, тормозит активность ряда ферментов гликолиза, но активирует фруктозо-1,6-дифосфатазу.

Таким образом, КФ можно рассматривать как фактор, осуществляющий переключения гликолиза на глюконеогенез в условиях, когда мышца получает необходимую для работы энергию за счет расщепления жирных кислот. Анализ взаимосвязи креатинкиназной реакции с процессами активации жирных кислот при их  $\beta$ -окислении может быть полезным при изучении креатинкиназной системы клеток миокарда, для которых жирные кислоты являются важным источником энергии [30]. В свою очередь сведения об особенностях регуляции, связанной с креатинкиназной реакцией в мышечных клетках, могут способствовать более глубокому пониманию такой регуляции в клетках мышц.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лызлова С. И. Фосфагенкиназы.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1974.
2. Сакс В. А., Розенштраух Л. В., Шаров В. Г., Емелин И. В., Чазов Е. И. Роль креатинфосфокиназных реакций в энергетическом метаболизме сердечных клеток.— В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1979, 215—241.
3. Перессова Л. С., Лызлова С. И., Ашмарин И. П., Потапенко Л. М. Об энергетическом обеспечении подвижности лейкоцитов.— В кн.: Мышечные формы подвижности. Пушкино: Изд-во АН СССР, 1976, 159—166.
4. Berlet H. H., Bonsman J., Birringer B. Occurrence of free creatine, phosphocreatine and creatine phosphokinase in adipose tissue.— *Biochim. biophys. Acta*, 1976, 437, 166—174.
5. Friedhoff A. J., Lerner M. H. Creatine kinase isoenzyme associated with synaptosomal membrane and synaptic vesicles.— *Life Sci.*, 1977, 20, 867—879.
6. Ерашова И. С., Сакс В. А., Шаров В. Г., Лызлова С. И. Креатинкиназа ядер мышечных клеток.— *Биохимия*, 1979, 44, 372—378.
7. Hickey E. D., Weber L. A., Baglioni C. Nuclease activity in preparations of creatine phosphokinase: effect on mRNA stability.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 80, 2, 377—383.
8. Seraydarian M. W., Abbott B. C. The role of the creatine-phosphorylcreatine system in muscle.— *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1976, 8, 741—746.
9. Seraydarian M. W., Artaza L. Regulation of energy metabolism by creatine in cardiac and skeletal muscle cells in culture.— *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1976, 8, p. 669—678.
10. Четверикова Е. П., Розанова Н. А. Аллостерические свойства мышечной креатинкиназы.— *Биохимия*, 1971, 42, 481—489.

11. *Seraydarian M. W., Artaza L., Abbott B. C.* Creatine and the control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle cells in culture.—*J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1974, 6, 406—413.
12. *Krzanowski J., Matschinsky F. M.* Regulation of phosphofructokinase by phosphocreatine and phosphorylated glycolytic intermediates.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 34, 816—823.
13. *Kemp R. G.* Inhibition of muscle pyruvate kinase by creatine phosphate.—*J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 3963—3967.
14. *Oguchi M., Certh E., Fitzgerald B., Park J. H.* Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by phosphocreatine and adenosine triphosphate. IV Factors affecting in vivo control of enzymatic activity.—*J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 5571—5576.
15. *Fu J. Y., Kemp R. G.* Activation of muscle fructose 1,6-diphosphatase by creatine phosphate and citrate.—*J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 1124—1125.
16. *Белуцкер В. А.* Химические превращения в мышце.—М.—Л.: Медгиз, 1940.
17. *Dhalla N. S., Yates J. C., Walz D. A., McDonald V. A., Olson R. E.* Correlation between changes in the endogenous energy stores and myocardial function due to hypoxia in the isolated perfused rat heart.—*Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1972, 50, 333—345.
18. *Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I.* Studies on energy transport in heart cells.—*Eur. J. Biochem.*, 1975, 57, 273—290.
19. *Singh D., Tamao J., Blakley R. L.* Allosterism regulation and cooperativity: the case of ribonucleotide reductase of *lactobacillus leichmanii*.—*Adv. Enzym. Reg.*, 1977, 15, 81—100.
20. *Watts D. C.* Creatine kinase (Adenosine-5'-triphosphate-creatine phosphotransferase).—In: *The Enzymes*/ Ed. J. D. Boyer. Acad. Press, New York, 1973, p. 383—455.
21. *McLanghlan A.* The interaction of 8-aniline-1-naphthalene-sulfonate with creatine kinase.—*J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 1445—1452.
22. *Kumudavalli J., Moreland B. H., Watts D. C.* Properties and reaction with iodacetamide of adenosine-5'-triphosphate-creatine phosphotransferase from human skeletal muscle. Further evidence about the role of the essential thiol group in relation to the mechanism of action.—*Biochem. J.*, 1970, 117, 575—583.
23. *Price N. C.* Effect of temperature and reagent size on the reaction of the thiol groups of rabbit muscle creatine kinase.—*Biochem. Soc. Trans.*, 1977, 5, 764—765.
24. *Lec C. S., Nicholson G. A., O'Sullivan W. J.* Some properties of human skeletal muscle creatine kinase.—*Aust. J. Biol. Sci.*, 1977, 30, 507—515.
25. *Розанова Н. А., Четверикова Е. П.* Влияние фосфатов сахаров, фосфоенолпирувата и адениловой кислоты на крeатинкиназу скелетных мышц, мозга и сердца.—*Биохимия*. 1965, 40, 1299—1304.
26. *Moldoveanu N.* Influence of glycolysis final terms, iodacetamide and 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene on the miokinase and creatine kinase activity.—*Rev. Roum. Biochem.*, 1970, v. 7, p. 123—128.
27. (*Malkolm L. R.*) *Малькольм Л. Р.* Химическая биология рыб: Пер. с англ. М.: Пищевая промышленность, 1976.
28. (*Hochachka P. W., Somero G. N.*) *Хочачка П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации: Пер. с англ. М.: Мир, 1977.
29. (*Newsholm E. A., Start C.*) *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма: Пер. с англ. М.: Мир, 1977.
30. *Neely J. R., Morgan H. E.* Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle.—*Ann. Rev. Physiol.*, 1974, v. 36, p. 1418.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ СТРУКТУРНОЙ НЕЭКВИВАЛЕНТНОСТИ СУБЪЕДИНИЦ F-АКТИНА ТОНКИХ НИТЕЙ

В. В. ЛЕДНЕВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее было показано, что появление запрещенных меридиональных рефлексов на рентгенограммах ориентированных гелей актинсодержащих нитей [1, 2] свидетельствует о том, что субъединицы F-актина способны находиться в двух различных структурных состояниях [2]. Модель тонких нитей, учитывающая эту структурную особенность F-актина, соответствует имеющимся данным о структуре и физико-химических свойствах актинсодержащих нитей и позволяет объяснить ряд опытных фактов, не имевших ранее какой-либо интерпретации. В данной статье, являющейся продолжением и развитием работы Г. М. Франка с автором [3], мы рассмотрим связь некоторых структурных особенностей тонких нитей с уравнением Хилла и механизмом сопряжения работы сократительного аппарата мышц с величиной внешней нагрузки.

За элементарную структурную единицу (мономер) тонкой нити можно принять ее отрезок длиной 38,5 нм, составленный из двух комплементарных функциональных единиц (ФЕ)<sup>1</sup>, именуемый ниже для краткости «блок». В одном из возможных структурных состояний блока 2 ФЕ «выключены», в другом — лишь 1 ФЕ «включена». Структуру тонкой нити в покоящейся мышце можно рассматривать как линейную цепочку, состоящую из «выключенных» блоков. При добавлении в среду  $Ca^{2+}$  начинается переход ФЕ во «включенное» состояние, продолжающийся до тех пор, пока между «включенными», или активированными, и «выключенными», или ингибированными, ФЕ (или соответственно между А- и I-блоками) не установится динамическое равновесие.

Если проекция блока на продольную ось тонкой нити в одном из двух структурных состояний имеет большую длину по сравнению с проекцией в другом состоянии, то динамическое равновесие между двумя типами блоков при заданной концентрации  $Ca^{2+}$  может быть сдвинуто при растяжении тонкой нити внешней нагрузкой или, в общем случае, в случае приложения внешней силы.

А priori неясно, однако, в какую сторону будет сдвигаться равновесие между А- и I-состояниями ФЕ. Сопоставление параметров спирали F-актина в тонких нитях покоящейся и сокращаю-

<sup>1</sup> Функциональная единица — белковый блок, состоящий из 7 субъединиц F-актина, покрытых тропомиозин-тропоминовой парой.

щейся мышцы [4], а также в  $M^{2+}$ -паракристаллах, полученных при концентрациях  $10^{-5} M \leq Ca^{2+} \leq 10^{-9} M$  [5], свидетельствует о возможном незначительном увеличении шага спирали F-актина в сокращающейся мышце. Поэтому можно считать, что «включенному» состоянию ФЕ соответствует более растянутое структурное состояние субъединиц. Ясно, что наличие внешней растягивающей силы должно привести к «включению» дополнительного числа ФЕ при заданной концентрации  $Ca^{2+}$ . Термодинамические свойства некоторых простых моделей такого рода структур рассматривались рядом авторов в расчетах упругости и других характеристик линейных полимеров [6, 7]. При аналитическом рассмотрении зависимости активации тонких нитей от концентрации  $Ca^{2+}$  и величины внешней нагрузки необходимо учитывать положительную и отрицательную кооперативность взаимодействия между активными субъединицами [2, 3], наличие нескольких мест связывания  $Ca^{2+}$  на тропонине (возможно, взаимодействующих между собой) и другие факторы, количественные характеристики которых пока еще недостаточно изучены. Выражение зависимости числа «включенных» ФЕ тонких нитей от величины внешней нагрузки мышечного волокна можно, однако, получить косвенным путем, исходя из предположения, что механизм регуляции работы механохимического преобразователя (МХП) мышечного волокна, обеспечивающий гиперболическую зависимость скорости укорочения мышцы от величины внешней нагрузки, основан исключительно на описанных выше свойствах тонких нитей, т. е. на зависимости степени активации тонких нитей как от концентрации  $Ca^{2+}$ , так и от величины растягивающей их внешней силы.

### УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА

Соотношение между скоростью изотонического укорочения  $v$  и нагрузкой  $P$  ( $P$  —  $v$ -зависимость) возбужденной скелетной мышцы может быть описано различными формулами, из которых наиболее известно характеристическое уравнение Хилла [8]:

$$(P+a)(v+b) = (P_0+a)(v_{\max}+b)a,$$

где  $P_0$  — изометрическое напряжение, развиваемое при неизменной длине мышцы;  $a$  и  $b$  — константы. Аналогичное по структуре уравнение описывает также скорость выделения дополнительной (по сравнению с изометрическим сокращением) энергии в виде работы и тепла при изотоническом сокращении мышцы.

Совпадение по форме записи «термического» и «механического» уравнений Хилла и, более того, совпадение в них величин тепловой и механической констант (по данным Hill, полученным в 1933 г. [8]) приводило к мысли о том, что характеристическое уравнение Хилла «представляет собой нечто большее, чем просто математический способ описания экспериментальных результатов» ([9], с. 95). Однако в 1964 г. Hill показал на основании

более точных измерений, что константа «а», полученная из термических измерений и равная теплоте», выделяемой при укорочении мышцы на 1 см (теплота укорочения), несколько отличается от величины соответствующей механической константы [10].

Тем не менее ставить точку в истории поисков «смысла» уравнения Хилла, видимо, преждевременно. В середине 60-х годов Sarfan с помощью методов термодинамики необратимых процессов показал, что уравнение Хилла описывает отношение выходных характеристик наиболее простого класса, самоадаптирующихся к величине внешней нагрузки преобразователей энергии [11—13]. Регуляция «выхода» в таких преобразователях энергии возможна с помощью двух различных механизмов, действующих раздельно или совместно.

В терминологии концепции «скользящих нитей» и мостиковой теории Нухлеу эти возможные типы регуляции означают следующее. При регуляции первого типа [14, 15] под влиянием внешней нагрузки меняется число активированных мостиков, каждый из которых можно рассматривать как элементарный линейный МХП энергии; при этом эффективность преобразования химической энергии в механическую (КПД) как отдельным мостиком, так и целой мышцей не изменяется.

При регуляции второго типа [11—13] изменение величины внешней нагрузки приводит к изменению степени сопряжения химического и механического процессов, т. е. эффективности преобразования свободной энергии гидролиза АТФ в механическую. Wilkie и Woledye [16], а также Bornhorst и Minardi [14, 15] показали, что модель Каплана плохо соответствует экспериментальным данным.

Сопоставление результатов этих теоретических работ с представлениями, изложенными выше, позволяет предположить, что мышечное волокно можно рассматривать как МХП, нелинейность «выхода» которого обеспечивается регулятором взаимодействия сократительных нитей. Функции его выполняют толстые (актинсодержащие) нити. Они обуславливают зависимость числа «включенных» ФЕ тонких нитей от величины внешней нагрузки мышцы, и именно эта структурная особенность тонких нитей определяет гиперболическую зависимость скорости укорочения мышцы от величины нагрузки, выражаемую уравнением Хилла.

Сравнивая феноменологическое уравнение Оизагера, записанное для мышечного МХП, с уравнением Хилла, можно получить следующее аналитическое выражение зависимости числа «работающих» мостиков от величины внешней нагрузки (см. равенство (19) в [14]):

$$\frac{n}{n_0} = \frac{a/P_0 + P/P_0}{a/P_0 + 1}, \quad (1)$$

где  $n$  и  $n_0$  — число замкнутых мостиков при нагрузках  $P$  и  $P_0$  соответственно ( $P_0$  — изометрическая нагрузка). Мы предполагаем,



что указанная зависимость обусловлена структурно-функциональными свойствами тонких нитей. Однако при выводе выражения (1) физическая природа зависимости числа работающих мостиков от внешней нагрузки, т. е. природа регулятора МХП, не конкретизировалась. Выражение (1), полученное из предположения о применимости уравнения Онзагера к описанию мышечного механического преобразователя, можно получить также, предполагая изотонический характер силы внутреннего трения мышцы [17, 18] или вводя представление о существовании «тормозящих» мостиков, число которых определяется кинетической константой, пропорциональной скорости укорочения мышцы [19, 20].

Как видно из уравнения (1), при заданной нагрузке  $P$  число «включенных» ФЕ тонких нитей  $n$ , следовательно, число работающих мостиков однозначно определяется величиной параметра «а». Напомним, что уравнение (1) описывает сокращение мышцы при тетанической стимуляции, т. е. при концентрации свободного  $Ca^{2+}$  внутри саркомера, равной  $10^{-5} \div 10^{-6}$  М. Выражение (1) можно записать в следующем виде:

$$\frac{n}{n_0} = x + (1-x) \frac{P}{P_0}, \quad (2)$$

где величина  $x = \frac{a/P_0}{1+a/P_0}$  соответствует доле ФЕ (или мостиков), включаемых при тетанической стимуляции ненагруженной мышцы ( $P=0$ ). Второй член правой части равенства (2) выражает долю актомиозиновых мостиков, образующихся в изотонически сокращающейся мышце за счет активации тонких нитей под действием внешней растягивающей силы  $P$ . Как известно, величина константы  $a/P_0$  для скелетной мышцы лягушки равна примерно 0,25, так что из (1) следует:  $\frac{n}{n_0} = 0,2 + 0,8 P/P_0$ . Таким образом, при тетанической стимуляции скелетной мышцы, изотонически сокращающейся при нулевой нагрузке, «включается» лишь 0,2 общего числа ФЕ.

Имеющиеся в литературе данные подтверждают справедливость равенства (2). Так, зависимость жесткости<sup>1</sup> изотонически сокращающегося одиночного волокна скелетной мышцы лягушки от величины внешней нагрузки (см. [21], рис. 6) хорошо аппроксимируется равенством (2) со значением параметра  $x=0,2$ . Аналогичной формулой могут быть описаны данные об изменении жесткости целой портяжковой мышцы жабы в фазе развития изометрического напряжения (см. [22], рис. 3, а).

Таким образом, два структурных состояния ФЕ актинсодержащих нитей обуславливают обратную связь между сократительным

<sup>1</sup> Жесткость мышц — отношение  $\Delta T/\Delta L$ , где  $\Delta T$  — изменение напряжения мышцы при ступенчатом изменении ее длины на величину  $\Delta L$ , является мерой числа мостиков, замкнутых на тонкие нити в данный момент [23].

аппаратом и величиной внешней нагрузки мышцы. Это представление позволяет по-новому подойти к вопросу о сопряжении работы исполнительной и энергетической систем мышцы.

## СОПРЯЖЕНИЕ ИСПОЛНИТЕЛЬНОЙ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМ МЫШЦЫ

В настоящее время в литературе все чаще встречается термин «согласованная регуляция» процессов мышечного сокращения, используемый обычно в узком смысле хорошо установленного факта синхронного запуска взаимодействия сократительных нитей и гликогенолиза при повышении внутрисаркомерной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [24]. Очевидно, что для экономичной работы мышцы необходимы не только синхронизация запуска исполнительной и энергетической систем, но и пропорциональность развиваемой мышцей силы величине внешней нагрузки, а также пропорциональность количества расходуемого и синтезируемого топлива АТФ-суммарному энергорасходу мышцы в виде механической работы и тепла. К такому выводу можно прийти, исходя из общих соображений: эволюционный отбор систем синтеза АТФ с высоким выходом АТФ на единицу используемого субстрата может иметь «смысл» лишь при условии экономного использования АТФ клеточными энергетическими преобразователями и, в частности, сократительным аппаратом мышцы.

Экспериментально установлены следующие факты соответствия между выделением мышцей тепла, с одной стороны, и расходом и синтезом макроэргических соединений — с другой. При блокировании процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза количество расщепленного КФ (и соответственно АТФ, на восстановление запасов которой расходуется КФ) оказывается пропорциональным полной энергии (работа+тепло), выделяемой мышцей при различных режимах работы [25—28]. С другой стороны, результаты изучения соотношения между продукцией лактата и энерговыделением в интактной мышце, работающей в анаэробных условиях [27], свидетельствуют о том, что мышца «способна» обеспечить не только прямую пропорциональность между энерговыделением и расходом АТФ, но и пропорциональную зависимость между энерговыделением и интенсивностью процессов синтеза «макроэргов». Недавно В. Моммерте и соавт. показали, в частности, существование прямой пропорциональности между количеством активированной фосфоорилазы и полным энерговыделением полусухожильной мышцы лягушки, работающей в различных режимах в анаэробных условиях, однако эти авторы не смогли пайти объяснения выявленной ими закономерности [29, 30]. Из этих выборочных данных следует, что в мышце действительно существует связь, обеспечивающая пропорциональность между величиной внешней нагрузки и степенью активации сократитель-

ного аппарата, позволяющая мышце экономно использовать запас АТФ. Вместе с тем в мышце имеется связь между сократительным аппаратом и энергетической системой, благодаря которой осуществляется пропорциональность между процессами синтеза «макроэргов» и их потребления при работе сократительного аппарата. В литературе отсутствуют объяснения этих закономерностей.

Как мы показали выше, структурные особенности актинсодержащих нитей способны в принципе обеспечить линейную зависимость между величиной внешней нагрузки мышцы и числом «включенных» элементарных генераторов силы (см. равенство 1), что в свою очередь приводит к линейной зависимости скорости энерговыделения мышцы от величины внешней нагрузки в соответствующих моделях мышечного сокращения (см. равенство 27 в работе [14]).

Менее ясен вопрос относительно молекулярного механизма регуляции работы систем энергообеспечения мышцы. Как известно, производство АТФ в скелетной мышце в аэробных условиях осуществляется последовательно в процессе гликолиза, затем в цикле Кребса и в цепи переноса электронов, причем исходным субстратом для двух последних звеньев энергетической системы служит продукт гликолиза — пироват. Ниже мы покажем, что механизм сопряжения работы указанных систем опять-таки может быть основан на зависимости структурного состояния тонких нитей от величины внешней нагрузки.

За последние 10 лет было установлено, что большинство ферментов гликолитического цикла способно, по крайней мере при некоторых условиях, специфически связываться с чистым F-актином и с реконструированными тонкими нитями [31]. Имеются веские основания полагать, что некоторые из этих ферментов, именуемые часто «растворимыми», в действительности *in vivo* связаны с тонкими нитями [31]. Во всяком случае соотношение суммарной концентрации гликолитических ферментов и актина показывает, что все гликолитические ферменты могут быть адсорбированы, причем с большим запасом, тонкими нитями [31]. Показательно, что фосфофруктокиназа, рассматриваемая на основании данных *in vitro* как ключевой фермент в регуляции интенсивности гликолиза и гликогенолиза, имеет наибольшее среди гликолитических ферментов сродство к актину [31, 32].

В ряде работ высказывались предположения, что связывание гликолитических ферментов с тонкими нитями может каким-то образом влиять на кинетические параметры этих ферментов и на интенсивность гликолиза. При этом предполагалось, что регуляция кинетических параметров гликолитических ферментов может осуществляться за счет как сорбции и десорбции этих ферментов на тонких нитях, так и изменения взаимодействия гликолитических ферментов с тропомиозин-тропоинновой компонентой тонких нитей [31, 33, 34].

Новая модель структуры тонкой нити позволяет объяснить результаты, полученные при изучении взаимодействия гликолитических ферментов с тонкими нитями (с другой стороны, эти результаты могут рассматриваться как подтверждение новой модели тонких нитей), и вместе с тем предположить конкретный механизм сопряжения интенсивности гликолиза (и гликогенолиза) с величиной энергозатрат мышцы.

Согласно новой модели субъединицы F-актина в составе нитей чистого F-актина и в реконструированных тонких нитях (при  $[Ca^{2+}] \geq 10^{-5}$  M) имеют две различные конформации, в то время как при  $[Ca^{2+}] \leq 10^{-8}$  M субъединицы актина в тонких нитях имеют одну и ту же конформацию. В соответствии с этим можно ожидать, что связывание гликолитических ферментов с чистым F-актином и с F-актином тонких нитей при ( $[Ca^{2+}] \geq 10^{-5}$  M) может быть охарактеризовано двумя различными константами связывания. При этом модель предсказывает, что при полном насыщении актина каким-либо ферментом половина его будет связана с актином с одной константой связывания, а вторая половина — с другой. Именно эта ситуация и наблюдается в эксперименте при изучении связывания альдолазы с чистым F-актином [31, 33—36], хотя авторы исследований объясняют свои данные, предполагая (по нашему мнению, ошибочно) существование двух разных центров связывания с актином на поверхности альдолазы [31, 34]. На основании новой модели тонких нитей можно ожидать, что связывание альдолазы с тонкими нитями в среде, содержащей  $Ca^{2+}$ , будет характеризоваться лишь одной константой связывания. Это можно легко проверить экспериментально.

Переключение структурного состояния субъединиц F-актина в составе тонких нитей при изменении концентрации  $Ca^{2+}$  может обеспечить  $Ca^{2+}$ -чувствительность кинетических параметров гликолитических ферментов. При этом нет необходимости вводить представление о диссоциации — ассоциации гликолитических ферментов и актина в зависимости от физиологического состояния мышцы. По нашему мнению именно таким образом следует интерпретировать данные Walsh и соавт., показавших, что кажущаяся константа связывания субстрата с альдолазой, «сидящей» на тонких нитях, возрастает в 5 раз при увеличении концентрации  $Ca^{2+}$  в пределах от  $10^{-8}$  до  $10^{-5}$  M, в результате чего происходит резкое увеличение каталитической активности альдолазы [37]. Очевидно, что доля «активированных» гликолитических ферментов может зависеть от величины внешней нагрузки мышцы точно так же, как от нее зависит число «включенных» субъединиц F-актина (или ФЕ тонких нитей). Мы полагаем, что указанная зависимость может лежать в основе механизма обеспечения количественной корреляции между энергорасходом мышцы и интенсивностью процессов синтеза АТФ.

Изложенные соображения показывают, что регуляция гликолиза на уровне отдельных гликолитических ферментов возможна

при изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  одновременно с регулирующей силой мышечного сокращения, т. е. по «параллельному» типу. Ранее предполагалось, что регуляция гликолиза может осуществляться только «последовательным» путем, т. е. по схеме: нервный импульс  $\rightarrow$  сокращение  $\rightarrow$  изменение концентрации адениннуклеотидов  $\rightarrow$  изменение интенсивности гликолиза (см. [38], с. 146, 147).

Рассмотренный выше путь регуляции процессов синтеза «макроэргов», конечно, не является единственно возможным. В частности, зависимость соотношения числа «включенных» и «выключенных» ФЕ, а следовательно,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих свойств тонких нитей как от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , так и от величины внешней нагрузки означает, что совокупность тонких нитей данного саркомера обладает свойствами  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера. Эффективная емкость его в сокращающейся мышце определяется внешней нагрузкой: меняя величину внешней нагрузки, можно менять уровень свободного  $\text{Ca}^{2+}$  внутри саркомера и соответственно регулировать интенсивность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов. Чем больше ФЕ будет «включено» за счет растяжения тонких нитей внешней нагрузкой, тем более высокой будет концентрация свободного Са в саркомере (при этом мы предполагаем, что при «включении» ФЕ их сродство с  $\text{Ca}^{2+}$  уменьшается). Таким путем может осуществляться, в частности, регуляция количества активированной киназы фосфоорилазы и соответственно интенсивность гликогенолиза, а также активность различных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых киназ и фосфоорилируемых ими регуляторных белков, определяющих в свою очередь процессы белкового синтеза в мышечной клетке. Именно так может осуществляться долговременная адаптация мышц к усиленной нагрузке при тренировках или в патологических условиях — при гипертрофии сердечной мышцы, изменении типа мышечных волокон при денервации и перекрестной иннервации и т. д.

В принципе возможны другие пути изменения интенсивности энергопродукции мышцы, в частности за счет аллостерического воздействия продуктов метаболизма (АДФ,  $\text{NH}_3$  и др.) на ферменты гликолитического цикла (существование такого рода регуляции в условиях *in vivo* часто необоснованно постулируется на основании экспериментальных данных, полученных *in vitro*).

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ СУЩЕСТВОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ В МЫШЦАХ

Сравнительное изучение распределения различных регуляторных систем мышц в животном мире показало, что унитарная «актиновая» регуляция свойственна скелетным мышцам позвоночных, унитарная «миозиновая» регуляция — мышцам моллюсков и гладким мышцам позвоночных, а двойная (т. е. «актиновая» и «миозиновая») — мышцам абсолютного большинства беспозвоночных животных [39].

Имеется ряд данных, свидетельствующих о возможном участии в скелетных мышцах позвоночных, помимо «актиновой», так же и «миозиновой» регуляции [40]. Если в дальнейшем эти данные будут подтверждены, это будет означать, что локализация рецепторов  $Ca$  на миозине является обязательной характеристикой сократительного аппарата всех типов мышц, в то время как в ряде случаев допустима утрата рецепторов  $Ca$  на актинсодержащих нитях. Ответ на вопрос о смысле эволюционного отбора различных систем регуляции в мышцах должен одновременно объяснять эти два фундаментальных факта, полученных в результате сравнительного изучения регуляторных систем мышц.

Нам представляется возможным, что участие  $Ca^{2+}$ -переключателя на миозиновых мостиках необходимо для обеспечения расслабления мышцы. Действительно, как мы показали выше, при изометрическом сокращении мышцы большая часть ФЕ «включается» за счет растяжения тонких нитей внешней нагрузкой, а  $Ca^{2+}$ , возможно, играет лишь роль триггера в процессе активации тонких нитей. Допустимо, что движение головки миозина от остова толстой нити по направлению к тонкой нити индуцируется «включением» противостоющей ему ФЕ, приводящим к изменению баланса действующих сил притяжения и отталкивания между ними. В таком случае даже после откачки  $Ca^{2+}$  из изометрически сокращающегося саркомера всегда найдется достаточное число «включенных» ФЕ, которые обеспечат взаимодействие мостиков с тонкими нитями и развитие мышцей силы до тех пор, пока не будут исчерпаны запасы АТФ. Хорошо известно, однако, что при одиночном изометрическом сокращении мышцы процесс расслабления начинается вскоре после достижения максимума напряжения. Способность мышечного волокна к расслаблению легко объяснить, если допустить, что взаимодействие данного мостика с тонкой нитью, по крайней мере его отход от остова толстой нити и продвижение по направлению к тонкой, возможны лишь при связывании  $Ca^{2+}$  легкими цепями миозиновой головки (мостика); соответственно, уход  $Ca^{2+}$  с легких цепей сопровождается возвращением миозиновой головки к остову толстой нити. Таким путем можно объяснить, в частности, почему скелетная мышца расслабляется даже при «включенных» за счет растяжения внешней нагрузкой ФЕ тонких нитей, а также почему способны расслабляться мышцы, имеющие лишь унитарную «миозиновую» регуляцию (напомним, что в тонких нитях, лишенных тропомиозина, т. е. представляющих собой комплекс F-актина с тропомиозином, всегда имеются «включенные» ФЕ, если в данном случае под таковыми понимать комплекс из 7 мономеров актина, покрытых молекулой тропомиозина).

Можно предположить также, что процесс фосфорилирования и дефосфорилирования легких цепей миозина в некоторых типах мышц и в двигательных системах немышечного типа также необходим не столько для запуска взаимодействия сократительных

нитей, сколько для обеспечения расслабления сократительного аппарата.

Рассмотрим вопрос о причинах утраты некоторыми мышцами «актиновой» регуляции. Возможно, наличие в гладких мышцах позвоночных, в мышцах моллюсков, а также в некоторых актомиезоподобных двигательных системах немышечного типа лишь унитарной регуляции «миозинового» типа связано с тем, что в этих мышцах молярное отношение актина/миозина гораздо выше, чем в скелетных. Значительная часть актиновых нитей в этих системах не взаимодействует с миозином вообще, а выполняет скорее всего структурную роль, обеспечивая, например, пластические свойства гладких мышц. В такой ситуации локализация  $\text{Ca}^{2+}$ -рецепторов на миозине позволяет обойтись меньшим количеством  $\text{Ca}^{2+}$  для активации сократительного аппарата и, кроме того, использовать менее мощные насосы, регулирующие уровень  $\text{Ca}^{2+}$  внутри мышечных клеток. Таким образом, в эволюционном отборе типа регуляции гладких мышц позвоночных и в мышцах моллюсков решающими могли быть такие факторы, как ограниченность запасов мобильного  $\text{Ca}^{2+}$ , с одной стороны, и экономия энергии, затрачиваемой на работу  $\text{Ca}^{2+}$ -насосов, — с другой.

В заключение отметим, что зависимость степени активации толстых нитей скелетных мышц от величины внешней нагрузки должна учитываться при изучении ряда других феноменов, таких, как связывание  $\text{Ca}^{2+}$  различными тропонинсодержащими системами, механическая активация и деактивация мышечного сокращения, реакция мышц на ступенчатое изменение их длины и др. Результаты анализа этих и ряда других вопросов приведены нами в обзоре [41].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hanson J., Lednev V., O'brien E. J., Bennett P.* Structure of the actin-containing filaments in vertebrate striated muscle.—Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 37, 311.
2. *Леднев В. В.* Природа запрещенных меридиональных рефлексов на рентгенограммах актинсодержащих нитей.—Докл. АН СССР, 1975, 225, 1430.
3. *Леднев В. В., Франк Г. М.* Структурная неэквивалентность субъединиц F-актина и ее возможное значение в регуляции АТФ-азной активности и развитии напряжения в скелетных мышцах.—Биофизика, 1977, XXII, 376.
4. *Huxley H. E., Brown W. J.* The low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction  $\alpha$  rigor.—J. mol. Biol., 1967, 30, 383.
5. *O'Brien E. J., Gillis J. M., Couch J.* Symmetry and molecular arrangement in paracrystals of reconstituted muscle thin filaments.—J. mol. Biol., 1975, 99, 461.
6. *Hill L. T.* Thermodynamics for chemists and biologists. Addison—Wesley, Reading, Mass., 1968.
7. *Burte H., Halsey G.* Effect of an external force on the rates of short long subunits transition in linear chain of two-state subunits.—Textile Rts.-J., 1947, 17, 465.

8. Hill A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle.—Proc. roy. Soc., Med., 1938, 126, 136.
9. (Pringle J.) *Прингл Дж.* Модели мышечного сокращения.—В кн.: Моделирование в биологии: Пер. с англ. М.: Изд-во иностран. лит-ры, 1963, с. 85.
10. Hill A. V. The effect of load on the heat shortening of muscle.—Proc. roy. Soc. Med., 1964, 159, 297.
11. Caplan S. R. A characteristic of self-regulated linear energy converters. The Hill force-velocity relation for muscle.—J. theor. Biol., 1966, 11, 63.
12. Caplan S. R. Autonomic energy conversion. I. The input relation: phenomenological and mechanistic considerations.—Biophys. J., 1968, 8, 1146.
13. Caplan S. R. Autonomic energy conversion. II. An approach to energetics of muscular contraction.—Biophys. J., 1968, 8, 1187.
14. Bornhorst W. J., Minardi J. E. A phenomenological theory of muscular contraction. I. Rate equations at a given length based an irreversible thermodynamics.—Biophys. J., 1970, 10, 137.
15. Bornhorst W. J., Minardi J. E. A phenomenological theory of muscular contraction. II. Generalised length variations.—Biophys. J., 1970, 10, 155.
16. Wilkie D. R., Woledge R. C., The application of irreversible thermodynamics to muscular contraction. Comments on a recent theory by S. R. Caplan.—Proc. roy. Soc. Med., 1967, 169, 17.
17. Volkenstein M. V. Muscular contraction.—Biochim. Biophys. Acta, 1969, 180, 562.
18. Akasawa K., Yamamoto M., Fujii K., Mashima H. A mechanochemical model for the steady and transient contractions of the skeletal muscle.—Jap. J. Physiol., 1976, 26, 9.
19. Децереоский В. И. Две модели мышечного сокращения.—Биофизика, 1968, 13, 928.
20. Deshcerevsky V. I. A kinetic theory of striated muscle contraction.—Biorheology, 1974, 7, 147.
21. Julian F. J., Sollins H. R. Variation of muscle stiffness with force at increasing speeds of shortening.—J. gen. Physiol. 1975, 66, 287.
22. Bressler B. H., Clinch N. T. The compliance of contracting skeletal muscle.—J. Physiol., 1974, 237, 477.
23. Huxley A. F. Review lecture. Muscular contraction.—J. Physiol., 1974, 243, 1.
24. Fisher E. H., Becker J. U., Blum H. E. et al. Concerted regulation of glycogen metabolism and muscle contraction in "Molecular Basis of Motility", 26 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 10—12 April, 1975, Mosbach/Baden, S. 137.
25. Wilkie D. R. Heat, work and phosphoril-creatine bveakdown in muscle.—J. Physiol., 1968, 195, 157.
26. Wilkie D. K. Energy transformation in muscle.—In: Molecular Basis of Motility, 26 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 10—12 April, 1975, Mosbach/Baden, S. 69.
27. Woledge R. C. Heat production and chemical change in muscle.—Progr. Biophys. mol. Biol., 1971, 22, 37.
28. Woledge R. C. In vitro calorimetric studies relating to the interpretation of muscle heat experiments.—Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 27, 629.
29. (Mommeerts W. F. H.) *Моммертс В.* Современные проблемы метаболизма миокарда.—В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1975, с. 8.
30. Mommaerts W. F. H., Vegh K., Homsher E. Activation of phosphorilase in frog muscle as determined by contractile activity.—J. gen. Physiol., 1975, 66, 657.
31. Clarke F. M., Masters C. J. Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes.—Int. J. Biochem., 1976, 7, 359.
32. Arnold H., Henning R., Pette D. Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with G-actin.—Eur. J. Biochem., 1971, 22, 121.



33. *Arnold H., Pette D.* Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle.—*Eur. J. Biochem.*, 1968, 6, 163.
34. *Arnold H., Pette D.* Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase.—*Eur. J. Biochem.*, 1970, 15, 360.
35. *Clarke F. M., Morton D. L.* Aldolase binding to actin-containing filaments.—*Biochem. J.*, 1976, 159, 797.
36. *Morton D. J., Clarke F. M., Masters C. J.* An electron microscope study of the interaction between fructose diphosphate aldolase and actin-containing filaments.—*J. cell. Biol.*, 1977, 74, 1016.
37. *Walsh T. P., Clarke F. M., Masters C. J.* Modification of the kinetic parameters of aldolase or binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle.—*Biochem. J.*, 1977, 165, 165.
38. (*Newsholm E., Start K.*) *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма: Пер. с англ.—*М.: Мир*, 1977.
39. *Lehman W., Szent-Gyorgyi A. G.* Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control  $\alpha$  myosin control in animal kingdom.—*J. gen. Physiol.*, 1975, 66, 1.
40. *Lehman W.* Thick-filament-linked calcium regulation in vertebrate striated muscle.—*Nature*, 1978, 274, 281.
41. *Леднев В. В.* Некоторые аспекты регуляции мышечного сокращения.— В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности. *М.: Наука*, 1979.

УДК 612.741.15

## ВЛИЯНИЕ ФАЛЛОИДИНА НА НЕСТАЦИОНАРНУЮ КИНЕТИКУ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

А. Е. БУКАТИНА, В. Н. МОРОЗОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Роль актина в механохимическом процессе мышцы нельзя считать окончательно установленной. На основании структурных и биохимических данных общепринято, что актин является кофактором сил и аллостерическим модификатором миозина. Согласно результатам рентгеноструктурного исследования, параметры активной спирали не меняются значительно при сокращении мышцы [1], поэтому конформационные изменения актина обычно не рассматриваются при моделировании мышечного сокращения. Однако относительная стабильность структурных параметров тонких нитей не исключает возможности небольших конформационных изменений в актине. Существуют экспериментальные данные о наличии конформационной подвижности актина, и это свойство рассматривается рядом авторов как необходимое условие преобразования энергии в мышце [2—4]. Для экспериментального исследования роли структурной подвижности актина в элементарном механохимическом процессе мышцы (цикл замыкания — размыкания миозинового мостика) нам казалось информативным изучение динамики мышечного сокращения под

влиянием агентов, изменяющих структурную стабильность F-актина. Особый интерес представляет исследованный Wieland и соавт. циклический пептид фаллоидин (Ph), так как он специфически связывается с актином [5], ускоряет полимеризацию G-актина [6] и увеличивает стабильность F-актина ко многим воздействиям: рН, ультразвуку [7], цитохалазину В, К1 [8], высокой температуре [9], но не вызывает грубых нарушений в функционировании актомиозиновых систем в растворе. По данным стационарной кинетики, Ph не влияет на активацию миозина актином и не изменяет  $Ca^{2+}$ -регуляцию актомиозина, содержащего регуляторные белки [6]. Поэтому мы предприняли исследование влияния Ph на сократительные свойства глициренизированных мышц.

## МЕТОДЫ

В работе была использована поясничная мышца кролика. Методика глициренизации описана ранее [10]. Волокна хранились до исследования в 50% растворе глицерина, 1 мМ ЭДТА, 6,7 мМ  $KH_2PO_4$  (рН 7,0) при  $-20^\circ C$  в течение 10 мес. Для исследования механических свойств волокон применялись следующие растворы: 1) ригорный раствор: 80 мМ KCl, 15 мМ имидазол, 5 мМ  $MgCl_2$ , 4 мМ ЭДТА; 2) расслабляющий раствор: 80 мМ KCl, 15 мМ имидазол, 5 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ АТФ, 2 мМ ЭДТА; 3) сокращающий раствор: расслабляющий с добавкой 1,8 мМ  $CaCl_2$ . рН всех растворов был 6,8. Концентрация  $Ca^{2+}$  вычислялась согласно [11]. В растворе  $2 pCa \geq 8,5$ .

Перед опытом волокна отмывали в 20% растворе глицерина, 1 мМ ЭДТА при  $0^\circ C$  в течение часа, а затем не менее часа в ригорном растворе. В экспериментах использовали тонкие пучки волокон диаметром  $< 0,1$  мм. Для измерения механических свойств концы пучка волокон длиной 7—9 мм укрепляли в зажимах, один из которых был жестко соединен с электромеханическим преобразователем ГМК-1, а другой — с оптическим датчиком силы с собственной частотой 50 Гц и жесткостью 1,35 мкМ/мг. Длина саркомеров волокон в ригорном растворе была  $\sim 2,5$  мкм. Укрепленные волокна помещали в расслабляющий раствор при  $0^\circ C$  и укорачивали до длины 2,2 мкм по мере нагревания этого раствора. После установления температуры раствора к нему добавляли сокращающий раствор до требуемой концентрации  $Ca^{2+}$ . Измерения проводили при непрерывном размещении раствора.

В экспериментах регистрировали изометрическое натяжение и динамическую характеристику длина — сила при амплитуде изменений длины от 0,1 до 0,5% длины мышцы и частотах от 0,3 до 5 Гц.

Для исследования влияния Ph на механические свойства волокон в кювету добавляли водный раствор 1 мМ Ph или волокна перемещали в кювету, содержащую добавленный Ph. В некото-

рых случаях волокна обрабатывали до опыта в ригорном растворе с концентрацией  $\text{Pn } 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  в течение 15 мин при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После добавления сокращающего раствора изометрическое натяжение волокон возрастало и величина работы, совершаемой ими за цикл, становилась положительной, что отражало способность мышц работать в автоколебательном режиме. Обычно для этого было достаточно повысить концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  до  $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  [12]. В некоторых случаях требовалось также слегка растянуть волокно. Положительные значения работы за цикл наблюдались в диапазоне от 0,5 до 1,5 Гц при  $20^\circ \text{C}$ . Повышение температуры на  $10^\circ \text{C}$  сдвигало этот интервал в область более высоких частот (обычно 1—3 Гц) и увеличивало изометрическое натяжение в  $\sim 2\frac{1}{2}$  раза.

Влияние  $\text{Pn}$  на контрактильные свойства волокон зависело от температуры. Результаты типичного опыта по влиянию  $\text{Pn}$  на сокращение волокон при  $20^\circ \text{C}$  приведены на рис. 62. Видно, что добавление  $\text{Pn}$  к волокнам, которые развивают активное натяжение и совершают положительную работу в цикле при  $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7} \text{ M}$ , приводит к многофазным изменениям изометрического натяжения и качественным изменениям динамической характеристики длина — сила. Эта характеристика наблюдалась в течение всего опыта.

Во всех десяти проведенных экспериментах величина работы за цикл после добавления  $\text{Pn}$  становилась положительной и смена знака работы совпадала по времени с прохождением изометрического натяжения через минимум. Видно, что хотя натяжение возвращается примерно к исходной величине, это не приводит к восстановлению релаксационных свойств. Из результатов видно также, что волокна сохраняют чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$ : они расслабляются до исходного уровня при помещении в расслабляющий раствор и развивают натяжение при последующих добавках  $\text{Ca}^{2+}$ . Волокна сохраняли также способность к укорочению: в конце опыта после освобождения они укорачивались в 2 раза. Чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  и способность к укорочению сохранялись и в растворах, содержащих  $\text{Pn}$ . Однако нам не удалось получить положительную работу за цикл при  $20^\circ \text{C}$  во всем исследованном диапазоне частот после добавления  $\text{Pn}$  ни путем увеличения содержания  $\text{Ca}^{2+}$  до  $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , ни отмыванием  $\text{Pn}$  в расслабляющем или ригорном растворе, ни растяжением волокон. Автоколебательный режим не был достигнут также у волокон, обработанных  $\text{Pn}$  без натяжения в ригорном растворе (см. раздел «Методы»). Однако после любой из применявшихся обработок волокна совершали положительную работу в цикле при температурах выше  $30^\circ \text{C}$  в интервале частот, характерном для этих температур. Общий ход

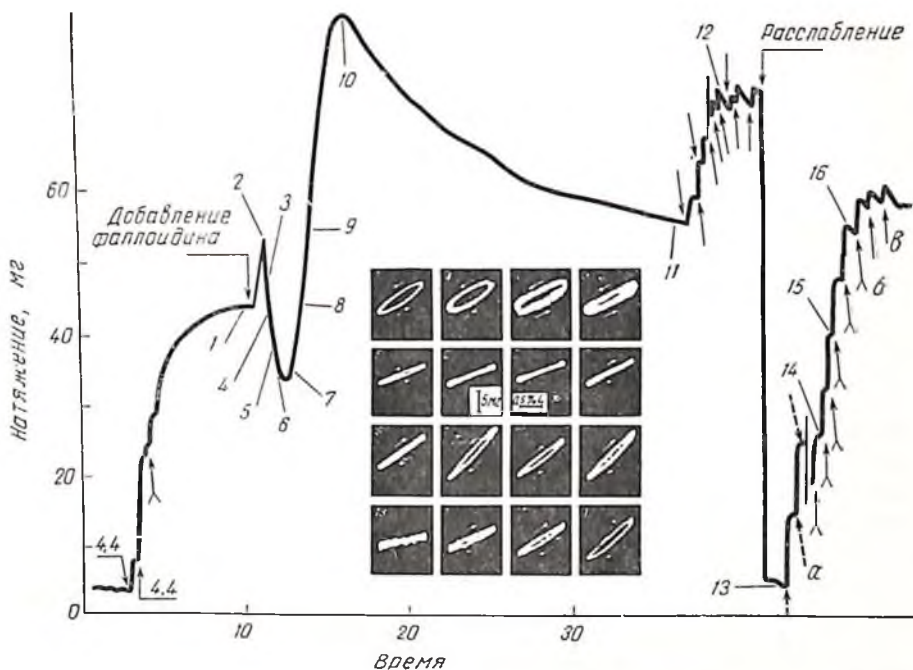


Рис. 62. Изменения изометрического натяжения и динамической характеристики длина — сила в ходе опыта при 20 °С. Исходное волокно находится в расслабляющем растворе. Цифры на стрелках указывают величину повышения уровня  $(Ca^{2+}) \cdot 10^8 M$  в результате добавления сокращающего раствора. Стрелки без цифр (а, б, в) — добавление сокращающего раствора, приводящее к повышению уровня  $Ca^{2+}$  на  $0,44 \cdot 10^{-8} M$ ,  $1,1 \cdot 10^{-8} M$  и  $2,2 \cdot 10^{-8} M$  соответственно. Фаллоидин был добавлен до концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5} M$ . Расслабление произошло после переноса в соответствующий раствор. Цифры в кружках — момент регистрации динамической характеристики длина — сила, приведенной на рисунке под тем же номером. Частота изменений длины 0,8 Гц. Направление движения изображающей точки указано стрелками. Движение против часовой стрелки соответствует совершению положительной работы за период.

изменений изометрического натяжения после добавления Ph при повышенной температуре оставался прежним, однако разные стадии ускорялись непропорционально. Это видно на рис. 63, где представлены изменения натяжения после обработки Ph, полученные на двух пучках волокон при разных температурах. После добавления Ph при 33° С иногда наблюдалось сужение эллипса, но работа за цикл оставалась не отрицательной и всегда могла стать положительной за счет растяжения волокон.

Для исследования влияния Ph на механические свойства ригорных волокон (рис. 64) пучок волокон был растянут в ригорном растворе (без предварительной инкубации в растворах с АТФ) до величины силы, сравнимой с развиваемой в активизирующем растворе. После растяжения начиналась релаксация силы.

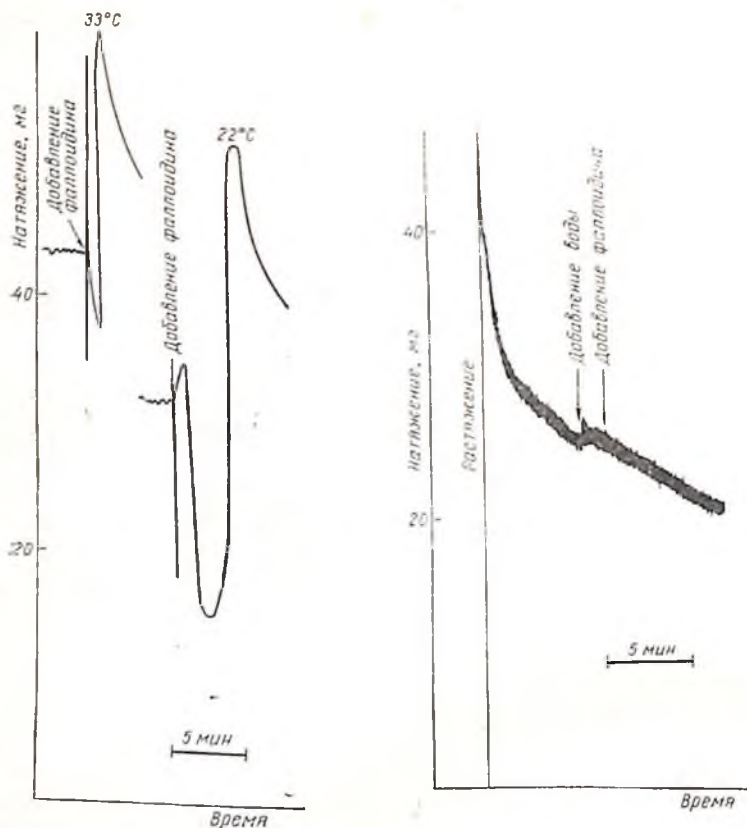


Рис. 63. Зависимость вызванных фаллоидином ( $4 \cdot 10^{-5}$  M) изменений изометрического натяжения от температуры при  $\text{Ca}^{2+} = 0,9 \cdot 10^{-7}$  M. Выбросы на кривых в момент изменения состава раствора являются артефактом, вызванным перенесением волокон в новую кювету.

Рис. 64. Влияние фаллоидина на механические свойства волокон в ригорном растворе. Фаллоидин добавлен до концентрации  $4 \cdot 10^{-5}$  M. Вода и раствор фаллоидина добавлены в равных объемах.

В течение всего опыта мышца подвергалась синусоидальным изменениям длины с частотой 0,5 Гц и амплитуды 0,1% от длины волокна. Ширина линии на записи силы служит мерой динамического модуля волокна. Видно, что добавление Ph практически не влияет ни на величину натяжения, ни на скорость его релаксации, ни на динамический модуль.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом проведенного исследования является установление факта изменения нестационарной кинетики мышечного сокращения под влиянием Ph.

Высокая специфичность связывания Ph с актином позволяет предположить, что наблюдаемые эффекты определяются взаимодействием Ph с топкими пиями, хотя данные о взаимодействии этого вещества с другими компонентами мышечного волокна отсутствуют. В пользу такого предположения говорит также факт необратимости действия Ph — свойства волокон не восстанавливались при отмывке им. Известно, что Ph очень прочно связывается с F-актином: 1 молекула Ph на 20 молекул G-актина не обменивается [6].

Кроме того, известно, что по влиянию на актин Ph конкурирует с дестабилизирующими воздействиями. Это соответствует наблюдению, что повышение температуры восстанавливает способность к автоколебательному режиму.

Мы не проводили количественного исследования релаксационных свойств волокон в широком временном интервале. Однако из данных литературы известно, что релаксационный спектр активированной сократительной системы мышц кролика дискретен и постоянные времена сильно различаются по величине [13, 14]. Поскольку у волокон, обработанных Ph, при 20° С положительная работа за цикл не наблюдалась во всем исследованном диапазоне частот, а при 30° С отмечалось только уменьшение величины работы в цикле без значительного смещения частотного интервала зоны положительной работы, можно думать, что под влиянием Ph изменяется (уменьшается или даже меняет знак) амплитуда процесса, ответственного за развитие задерживающегося натяжения, т. е. Ph влияет на величину активации мышцы растяжением.

Релаксационные параметры мышцы в рамках моделей, основанных на гипотезе скользящих нитей, определяются величинами кинетических констант взаимодействия актина и миозина, их зависимостью от координаты и силовой функцией индивидуального мостика [15, 16, 14]. Отсутствие действия Ph на механические свойства ригорной мышцы говорит (в предположении, что они отражают механические свойства замкнутого мостика активной мышцы) о влиянии его на кинетические параметры взаимодействия актина и миозина в ходе АТФ-азного цикла.

Большая величина, немопотожность изменений изометрического натяжения после добавления Ph и разная температурная чувствительность различных стадий этих изменений, по-видимому, свидетельствуют о влиянии Ph на несколько параметров. Поскольку он стабилизирует структуру F-актина, можно думать, что изменяющиеся параметры зависят от конформационной подвижности актина. Однако не исключено, что наблюдаемые изменения являются следствием модификации актина.

Для решения этой альтернативы требуется исследование изменений релаксационных спектров активной мышцы под влиянием широкого класса веществ, изменяющих структурную стабильность актина.

Авторы выражают благодарность М. Е. Саксон, которая расширила наш интерес к исследованию действия Ph на мышцу и предоставила препарат для проведения работы, а также С. Э. Шнолю за полезные дискуссии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Huxley H. E., Brown W.* The low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor.—*J. mol. Biol.*, 1967, 30, 383—434.
2. *Laki K.* Actin as an energy transducer.—*J. theor. Biol.*, 1974, 44, 117—130.
3. *Oosawa F., Fujime S., Inshiwata S., Mihashi K.* Dynamic property of F-actin and thin filament.—*Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37, 227—285.
4. *Леёнев В. В., Франк Г. М.* Структурная неэквивалентность субъединиц F-актина и ее возможное значение в регуляции АТФ-азной активности и развитии напряжения в скелетных мышцах.—*Биофизика*, 1977, 22, 376—388.
5. *Wieland Th., Govindan V. M.* Phallotoxins bind to actins.—*FEBS Lett.*, 1974, 46, 351—353.
6. *Dancker P., Löw I., Hasselbach W., Wieland Th.* Interaction of actin with phalloidin; polymerization and stabilization of F-actin.—*Biochim. biophys. Acta*, 1975, 400, 407—414.
7. *Löw I., Dancker P., Wieland Th.* Stabilization of actin polymer structure by phalloidin ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH.—*FEBS Lett.*, 1976, 65, 358—360.
8. *Löw I., Dancker P., Wieland Th.* Stabilization of F-actin by phalloidin reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B.—*FEBS Lett.*, 1975, 54, 263—265.
9. *De Vries J. X., Schäfer A. J., Faulstich H., Wieland Th.* Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins.—*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1976, 357, 1139—1143.
10. *Букарина А. Е.* Зависимость напряжения и АТФ-азной активности глицеринизированных мышечных волокон от относительной длины волокна.—*Биофизика*, 1971, 16, 52—59.
11. *Portzehl H., Caldwell P. C., Rüegg J. C.* The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free crab ions.—*Biochim. biophys. Acta*, 1964, 79, 581—591.
12. *Rüegg J. C., Steiger G. J., Schadler M.* Mechanical activation of the contractile system in skeletal muscle.—*Pflügers Arch.*, 1970, 319, 139—145.
13. *Kawai M.* Head rotation or dissociation? A study of exponential rate processes in chemically skinned rabbit muscle fibers when MgATP concentration is changed.—*Biophys. J.*, 1978, 22, 97—103.
14. *Abbott R. H., Steiger G. J.* Temperature and amplitude dependence of tension transients in glycerinated skeletal and insect fibrillar muscle.—*J. Physiol.*, 1977, 266, 13—42.
15. *Дежневский В. И.* Математические модели мышечного сокращения.—*М.: Наука*, 1977.
16. *Julian F. J., Sollins K. R., Sollins M. R.* A model for the transient and steady-state mechanical behavior of contracting muscle.—*Biophys. J.*, 1974, 14, 546—562.

## СХОДСТВО ЭЛЕМЕНТАРНЫХ СТАДИЙ ГИДРОЛИЗА АТФ В АТФ-АЗНЫХ СИСТЕМАХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

И. С. ПАНТЕЛЕЕВА, Э. А. КАРАНДАШОВ, И. Е. КРАСОВСКАЯ,  
Н. В. КУЛЕВА, Е. Г. СКВОРЦЕВИЧ, Л. А. СЫРЦОВА (СССР)

Два аспекта привлекают внимание при рассмотрении молекулярных основ переноса энергии в живых системах. Первый — сходство элементарных механизмов энергетических превращений в разных функциональных системах, работающих при участии АТФ. Второй — удивительная экономичность энергетических процессов, «умение» природы обходиться ограниченным числом элементарных стадий и реакций, взаимосочетание которых обеспечивает поразительное многообразие проявления жизнедеятельности. Здесь мы имеем феномен унификации в энергетике живых систем наряду с многообразием форм превращения энергии.

В 1979 г. исполнилось 40 лет со времени открытия В. А. Энгельгардом и М. Н. Любимовой АТФ-азных свойств миозина [1, 2]. За прошедшие годы изучению промежуточных стадий гидролиза АТФ миофибрилллярными, транспортными и другими АТФ-азами посвящены сотни экспериментальных работ и фундаментальных обзоров. Однако можно с уверенностью сказать, что лишь в последние годы мы приблизились к представлению о «сопрягающей стадии» — той стадии, на которой энергия, заключенная в АТФ, утилизируется в механическую и другие виды работы. Процесс осуществляется путем «энергизации» белков (АТФ-аз), путем консервации энергии АТФ в изомерных, конформационно измененных структурах с последующим ее освобождением для производства работы [2—7]. При этом «из всех видов трансформации энергии только деградация ее в форму тепла происходит непосредственно, без участия каких-либо специализированных механизмов. Во всех прочих случаях требуются определенные физические приспособления самой различной степени сложности» (В. А. Энгельгардт).

АТФ-азы — ферменты, с помощью которых утилизируется энергия АТФ, отличаются уникальной особенностью. Их субъединичная структура и пространственная организация весьма многообразны (рис. 65). И в то же время конечное химическое выражение итоговой ферментативной реакции для всех АТФ-аз одно: расщепление единственной связи  $O=P$  у  $\gamma$ -фосфорильной группы АТФ. Несомненно, что структурные различия обусловлены спецификой выполняемой биологической работы. Расщепляя одну и ту же связь в молекуле АТФ, различные по структуре АТФ-азы могут заменять друг друга. Миозиновая АТФ-аза, например, расщепляя АТФ, не может осуществлять транспорт  $Ca^{2+}$  против градиента концентрации и т. д. Значит, АТФ-азы строго специ-



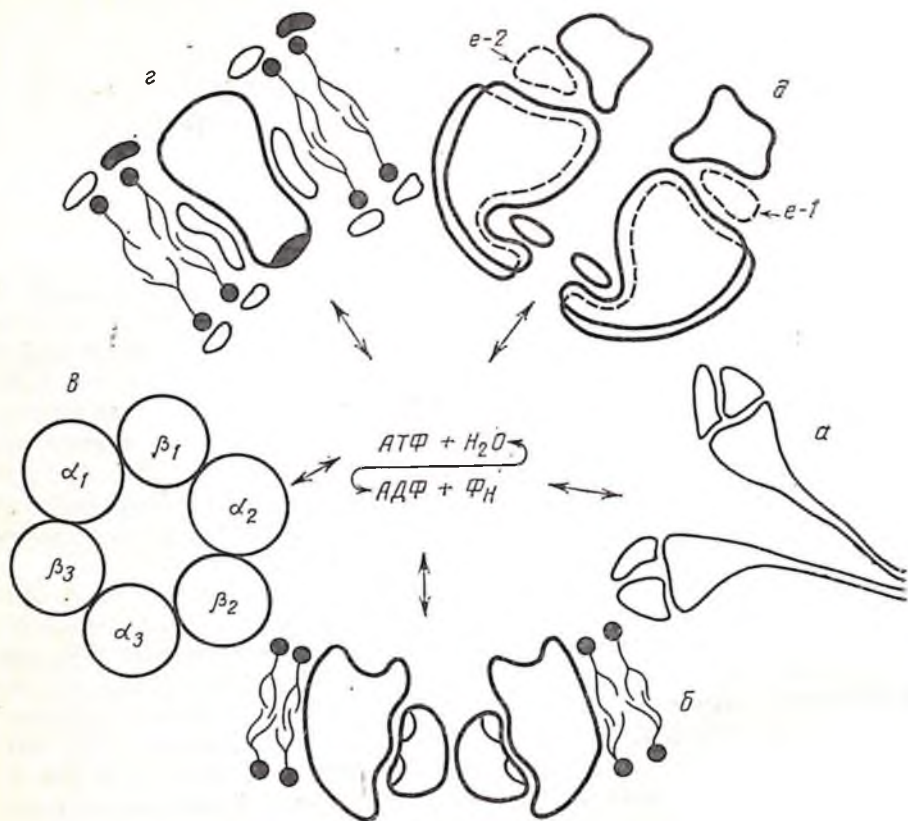


Рис. 65. Структурные комплексы АТФ-аз различной природы. а — миозиновая АТФ-аза (субфрагмент НММS I); б — Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> АТФ-аза; в — митохондриальная H<sup>+</sup>-АТФ-аза (F — фактор); г — митохондриальная АТФ-аза (F — фактор), Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup> -АТФ-аза; д — нитрогеназа (e-1 и e-2 — АТФ-азные центры).

фичны в отношении не только расщепляемой химической связи, но и процесса, который они обеспечивают энергией. Здесь мы имеем иллюстрацию феномена «единства в многообразии».

В данной статье этот феномен хотелось бы продемонстрировать на примере ряда АТФ-аз, изучаемых нами методом <sup>18</sup>O-обменных реакций. Метод <sup>18</sup>O-обмена в настоящее время все в большей степени используется в исследованиях механизма действия АТФ-аз. Он позволяет получать информацию о возможных ковалентных и нековалентных интермедiateх, о последовательности реакций присоединения и отщепления субстратов и продуктов реакции в каталитическом центре, о стадиях, лимитирующих скорость гидролиза в целом [3, 5, 6, 8—10]. <sup>18</sup>O-обменные реакции обнаружены в системах, связанных как с запасанием, так и с расходом энергии АТФ. <sup>18</sup>O-обмен сопровождается превращением АТФ и ортофосфата в системах мифобриллиарных АТФ-аз, в си-

стемах окислительного и фотосинтетического фосфорилирования и при функционировании транспортных АТФ-аз [3—13].

В настоящее время условно различают два вида реакций изотопного обмена кислорода, катализируемого АТФ-фосфогидролатами. Первый — интермедиарный  $^{18}\text{O}$ -обмен, протекающий или в промежуточной стадии прочно связанного АТФ с ферментом ( $\text{E} \cdot \text{АТФ} \rightleftharpoons \text{H}_2^{18}\text{O}$ ) или с фосфорилированным интермедиатом гидролиза ( $\text{E}-\text{P} \rightleftharpoons \text{H}_2^{18}\text{O}$ ). Второй — обмен со свободным  $\text{P}_i$ , добавленным в среду или образующимся в результате гидролиза ( $\text{H}_3\text{P}\text{O}_4 \rightleftharpoons \text{H}_2^{18}\text{O}$  или  $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ ).

В системах самого разного назначения, использующих энергию АТФ, обнаружены оба типа  $^{18}\text{O}$ -обменных реакций. Нами исследованы миофибриллярные и транспортные АТФ-азы, а также АТФ-азный центр нитрогеназы — фермента, фиксирующего атмосферный азот и восстанавливающего его в аммиак.

ТАБЛИЦА 7

ИНТЕРМЕДИАРНЫЙ И ПРЯМОЙ  $^{18}\text{O}$ -ОБМЕН В СИСТЕМЕ МИОФИБРИЛЛЯРНЫХ АТФ-АЗ (В ПРИСУТСТВИИ  $\text{Mg}^{2+}$ )

Препарат белка	Атомы $^{18}\text{O}$ на 1 молекулу $\text{P}_i$		
	интермедиарный $^{18}\text{O}$ -обмен	прямой $^{18}\text{O}$ -обмен	
		$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+} + \text{АДФ}$
Скелетный миозин (НММ или НММСI) кролика	2,1; 2,8	0; 0,2	2,9; 3,1
Актомиозин (или актоНММСI) кролика	0,10; 0,20	0,8; 2,8	—
Скелетный миозин карпа	1,48; 2,56	0,23; 0,32	0,55; 1,22
Гладкомышечный миозин из тонкого кишечника теленка	1,16; 0,82	0,10	0,26; 0,64

Из табл. 7 следует, что миозин от разных видов и из различных типов мышц катализирует интермедиарный  $^{18}\text{O}$ -обмен (в процессе гидролиза АТФ и в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ ), в то время как прямой  $^{18}\text{O}$ -обмен (в отсутствие гидролиза) очень низок. Последний стимулируется лишь АДФ и  $\text{Mn}^{2+}$ , а также при комплексобразовании с актином [8, 18]. Данные свидетельствуют о количественной разнице в величинах интермедиарного  $^{18}\text{O}$ -обмена для миозина из различных типов мышц: для скелетно-мышечного миозина кролика и карпа [15] величины обмена значительно выше, чем для сердечного [16] и гладкомышечного [28] миозина. Количественная разница несомненно отражает различия в скоростях однозначных промежуточных стадий гидролиза АТФ (табл. 8), катализируемого скелетным, сердечным и гладкомышечным миозином.

ТАБЛИЦА 8

КОНСТАНТЫ СКОРОСТЕЙ НЕКОТОРЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СТАДИЙ ГИДРОЛИЗА АТФ, КАТАЛИЗИРУЕМОГО МИОЗИНОМ ИЗ РАЗНЫХ ТИПОВ МЫШЦ

Стадии [6] и $k_i$ (с <sup>-1</sup> )	Скелетный миозин кролика [6]	Сердечный миозин быка [17]	Гладко-мышечный миозин цыпленка [18]
$K_2$ —M·АТФ $\rightleftharpoons$ M*·АТФ—	400	100	100
$K_2/K_2 = K$ —M*·АТФ $\rightleftharpoons$ M**·АДР·P <sub>1</sub> —	9	11	—
$K_4$ —M**·АДР·P <sub>1</sub> $\rightleftharpoons$ M*·АДР·P <sub>1</sub> —	0,065	0,019	0,06
$K_5$ —M*·АДР+P <sub>1</sub> $\rightleftharpoons$ M*·АДР—	1,4	0,3	0,6

Таким образом, несмотря на различия в молекулярной структуре, величинах АТФ-азной активности и физико-химических свойствах миозина разного происхождения, основные параметры механизма гидролиза АТФ (<sup>18</sup>O-обменные реакции и кинетические константы), отражающие его промежуточные стадии, очень сходны.

В 1972 г. нами впервые было установлено, что препараты Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азы из коркового слоя почек морской свинки катализируют прямой <sup>18</sup>O-обмен (между P<sub>1</sub> и H<sub>2</sub><sup>18</sup>O среды) [12]. Позже аналогичный результат был получен для Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азы из почек свиньи и электрического органа угря [20], а также из мозга быка [19, 21]. Исследование АТФ-азы из плазматических мембран мозговых синапсов показало, что зависящая от Ca<sup>2+</sup> АТФ-аза этих структур также катализирует прямой <sup>18</sup>O-обмен [19, 22]. Интермедиарного обмена в этой системе мы не обнаружили. Как следует из табл. 9, в присутствии АТФ он не проявляется, а в присутствии Ca<sup>2+</sup> тормозится (табл. 10). Указанные <sup>18</sup>O-обменные свойства сближают синапсомальную АТФ-азу с Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азой саркоплазматического ретикулума [23].

Изучение свойств прямого <sup>18</sup>O-обмена в разных системах позволило сделать важное наблюдение. Этот вид <sup>18</sup>O-обмена, катализируемый транспортными АТФ-азами, тормозится теми попами, которые активируют промежуточное фосфорилирование соответствующего фермента и переносятся через мембрану против градиента их концентраций (патрием в случае Na<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азы и кальцием в случае Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы). Это свойство прямого <sup>18</sup>O-обмена в определенных условиях может служить критерием принадлежности АТФ-азной системы к транспортным АТФ-азам.

Обнаружение сходных по характеру <sup>18</sup>O-обменных реакций у мпофибрилярных и транспортных АТФ-аз побудило нас обра-

ТАБЛИЦА 9

ИНТЕРМЕДИАРНЫЙ И ПРЯМОЙ  $^{18}\text{O}$ -ОБМЕН В СИСТЕМАХ ТРАНСПОРТНЫХ АТФ-АЗ

Препарат АТФ-азы	Атомы $^{18}\text{O}$ на 1 молекулу $\text{P}_i$	
	интермедиарный $^{18}\text{O}$ -обмен	прямой $^{18}\text{O}$ -обмен
Почечный ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза)	0,74; 1,5	1,75; 1,78
Мозговой ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза)	1,3; 1,4* 3,1**	3,81; 3,92* 0**
Синаптический ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза)	0	2,92; 3,62*** 1,64; 1,68****

\* Отношение  $\text{Na}^+ : \text{K}^+$  равно 130 : 20.\*\* Отношение  $\text{Na}^+ : \text{K}^+$  равно 149 : 1.\*\*\* В присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ .\*\*\*\* В присутствии  $\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$ .

ТАБЛИЦА 10

ВЛИЯНИЕ  $\text{Ca}^{2+}$  НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРЯМОГО  $^{18}\text{O}$ -ОБМЕНА В СИСТЕМЕ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-АЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СИНАПСОМ

Концентрация $\text{Ca}^{2+}$ , М	Число атомов $^{18}\text{O}$ на 1 молекулу $\text{P}_i$
0	1,76; 1,96
$10^{-6}$	1,16; 1,16
$10^{-5}$	1,16; 1,24
$10^{-4}$	0,80; 0,84

тяться к еще одной форме этого фермента, связанной с функционированием нитрогеназы, катализирующей восстановление молекулярного азота. Процесс сопряжен с гидролизом АТФ. Энергия его затрачивается на «сверхвосстановление» одного из компонентов нитрогеназы (Mo, Fe-белка), что и обеспечивает превращение нейтрального азота в аммиак. Особенностью нитрогеназы является то, что АТФ-аза (АТФ-азный центр), необходимая для работы азотфиксирующего фермента, находится на самом ферменте (см. рис. 65).

В системе нитрогеназы из *Azotobacter vinelandii* мы обнаружили прямой  $^{18}\text{O}$ -обмен (табл. 11). Инкубация нитрогеназы с  $\text{P}_i$ , обогащенным  $^{18}\text{O}$ , в отсутствие АТФ не приводит к изотопному обмену с кислородом воды. При добавлении АТФ прямой  $^{18}\text{O}$ -обмен достигает 0,9—1,1 атома  $^{18}\text{O}$  на 1 молекулу  $\text{P}_i$  в течение часа, т. е. он соизмерим с величинами прямого  $^{18}\text{O}$ -обмена в других АТФ-азных системах. Интересно отметить, что имеется прямое соответствие природы гидролизуемого субстрата и  $^{18}\text{O}$ -обмена. Из испытанных нами нуклеозидтрифосфатов АТФ-азный центр нит-

Изменяемые компоненты среды	Число атомов $^{18}\text{O}$ на молекулу $\text{P}_i$
Без АТФ	$0,1 \pm 0,01$
АТФ	$1 \pm 0,1$
АТФ, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	$0,6 \pm 0,06$
АТФ, <i>o</i> -фенантролин — $5 \cdot 10^{-3}$ М	$0,2 \pm 0,02$
АТФ, <i>n</i> -нитротрифенол — $2 \cdot 10^{-3}$ М	$0,1 \pm 0,1$
АДФ	$1,1 \pm 0,1$
АМФ	$0,15 \pm 0,02$
ЦТФ	$0,15 \pm 0,02$
ГТФ	$0,1 \pm 0,01$

Примечание. Условия инкубационной среды см. [24, 25].

рогеназы гидролизует только АТФ. Как видно из табл. 11, только этот нуклеотид стимулирует и кислородный обмен. Далее, *o*-фенантролин — ингибитор АТФ-азного центра тормозит и  $^{18}\text{O}$ -обмен. Все это свидетельствует о том, что прямой  $^{18}\text{O}$ -обмен, наблюдаемый в системе нитрогеназы, является интегральным свойством АТФ-азного центра фермента, подобно тому как этот обмен характерен для всех других специализированных АТФ-аз. Ингибирование прямого  $^{18}\text{O}$ -обмена *n*-нитротрифенолом может свидетельствовать о разрыве ацилфосфатной связи, образуемой фосфорилированным интермедиатом (E—P) при гидролизе АТФ в АТФ-азном центре.

Из табл. 11 видно, что дитионит, добавляемый в среду в качестве одного из компонентов (восстановитель) нитрогеназной реакции, тормозит прямой  $^{18}\text{O}$ -обмен. Нечто подобное мы имеем в случае транспортных АТФ-аз, когда определенный компонент функциональной системы понижает величину прямого  $^{18}\text{O}$ -обмена. Как уже отмечалось, таким компонентом в системе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы является переносимый ион  $\text{Na}$ , в системе  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы — переносимый ион  $\text{Ca}$ .

Таким образом, не только мнoзпoвая АТФ-аза, являющаяся механохимическим преобразователем энергии, или транспортные АТФ-азы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимые), участвующие в переносе катионов через биологические мембраны, но и АТФ-азный центр нитрогеназы — фермента, обеспечивающего восстановление молекулярного азота, катализируют  $^{18}\text{O}$ -обменные реакции.

Эти данные свидетельствуют о том, что на промежуточных этапах гидролиза АТФ имеются некоторые типовые стадии, характерные для всех АТФ-аз, независимо от вида работы, которую

они обеспечивают энергией. В случае мюозиновой и митохондриальной АТФ-аз  $^{18}\text{O}$ -обмен осуществляется, по-видимому, на уровне энергизированных белковых комплексов [5]:



Величина константы равновесия ( $K_3$ , см. табл. 8) этой стадии очень невелика. Boyer и соавт. [3] показано, что наибольшие изменения стандартной свободной энергии наблюдаются в стадии образования  $\text{E}^* \cdot \text{АТФ}$  ( $-12-13$  ккал/моль). Гидролиз по существу происходит в «твердой фазе» (on enzyme). В стадии истинного гидролиза  $\Delta G^0$  не превышает  $1,3-2,8$  ккал/моль [2-5, 26].

В случае транспортных АТФ-аз препаративно выделены фосфорилированные интермедиаты (ацилфосфаты), на уровне которых осуществляется  $^{18}\text{O}$ -обмен [20, 23, 27]:



Формой запасаания энергии в мембранных АТФ-азах, способствующей образованию ацилфосфата из свободного  $\text{P}_1$  среды, может служить как комплекс АТФ·фермент, так и градиент понов на мембране [10].

Показано, что при работе АТФ-азного центра пштрогеназы, по-видимому, образуют ацилфосфат [25]. Эти исследования продолжаются.

Из всего сказанного следует, что основной элементарный принцип взаимопревращений энергии, осуществляемых при участии АТФ, один.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Engelgardt V. A., Ljubimova M. N. Myosin and adenosinetriphosphatase.—Nature, 1939, 144, 668—669.
2. Пантелеева И. С. Современные представления о механизме гидролиза АТФ мюозином (к 40-летию открытия ферментативных свойств мюозиона). — Мол. биол., 1979, № 3, 485—496.
3. Boyer P. D., Stokes B. O., Wolcott R. G., Degani C. Coupling of "high-energy" phosphate bonds to energy transduction.—Fed. Proc., 1975, 34, 1711—1717.
4. Boyer P. D. New insights into ATP synthesis by heart mitochondria.—In: Proc. Third US-USSR joint symposium on myocardial metabolism. Williamsburg, Virginia, 1977, May, 9—11, p. 323—343.
5. Trentham D. R., Eccleston Y. F., Bagshaw C. R. Kinetic analysis of ATPase mechanisms.—Quart. Rev. Biophys., 1976, 9, p. 217—281.
6. Trentham D. R. The adenosine triphosphatase of myosin and actomyosin and their relation to energy transduction in muscle.—Trends Biochem. Sci., 1977, 5, 5—22.
7. Pantelceeva N. S. Comparative analysis of  $^{18}\text{O}$  exchange reactions catalyzed by ATPases of muscular and nonmuscular origin.—In: Proc. Third US-USSR joint symposium on myocardial metabolism. Williamsburg, Virginia, 1977, May, 9—11, p. 179—193.
8. Пантелеева И. С. Мюозин ( $^{18}\text{O}$ -обмен и фосфорилирование) /Под ред. И. П. Ашмарина. — Л.: изд-во Ленингр. ун-та, 1975.
9. Пантелеева И. С. Применение изотопа  $^{18}\text{O}$  для изучения механизма расщепления АТФ мюозином. — В кн.: Биофизические и биохимические

- методы исследования мышечных белков /Под ред. Г. Р. Иванникова. Л.: Наука, 1978, с. 198—210.
10. *Скулачев В. П., Козлов И. А.* Протоионные аденозинтрифосфатазы. Молекулярные и биологические генераторы тока. — М.: Наука, 1977.
  11. *Koshland D. E., Levy H. M.* Evidence for an intermediate in ATP hydrolysis by myosin. — In: *Biochemistry of muscle contraction*, V. 2, Boston, 1964, p. 87—93.
  12. *Скворцович Е. Г., Пантелеева Н. С., Писарева Л. Н.* Реакции изотопного обмена кислорода в системе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы. — Докл. АН СССР, 1972, 206, 240—242.
  13. *Bagshaw C. R., Trentham D. R., Wolcott R. G., Boyer P. D.* Oxygen exchange in the  $\gamma$ -phosphoryl group of proteinbound ATP during Mg-dependent adenosine triphosphatase activity of myosin. — *Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 1975, 12, 2592—2596.
  14. *Swanson Y. R., Yount R. G.* The properties of heavy meromyosin and myosin catalyzed "medium" and "intermediate"  $^{18}\text{O}$ -phosphate exchange. — *Biochem. Z.*, 1966, 345, 395—409.
  15. *Пантелеева Н. С., Красовская И. Е.* Реакции изотопного обмена кислорода, катализируемые миозином и актомиозином карпа. — Вестн. Ленинградск. ун-та. Сер. биол., 1972, 3(15), 80—87.
  16. *Dempsey M. E.* Phosphate-oxygen exchange reactions of contractile proteins. — In: *Contractile proteins and muscles* /Ed. K. Laki, M. Dekker, Inc. New York, 1971. p. 569—580.
  17. *Taylor R. S., Weeds A. G.* The magnesium-ion dependent adenosine triphosphatase of bovine cardiac myosin and its subfragment I. — *Biochem. J.*, 1976, 159, 301—315.
  18. *Morston S. B., Taylor E. N.* Mechanism of myosin and actomyosin in chicken gizzard smooth muscle. — *FEBS Letters*, 1978, 86, 167—170.
  19. *Пантелеева Н. С., Скворцович Е. Г., Кулиева Н. В.* и др.  $^{18}\text{O}$ -обменные реакции в системах транспортных АТФ-аз мозга. — В кн.: *Проблемы биохимии, первая сессия*. 1978, вып. 19, p. 136—144.
  20. *Dahms A. S., Boyer P. D.* Oxygen exchanges catalyzed by and the mechanism of acyl phosphate formation in transport ATPases. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1974, 242, 133—138.
  21. *Смирнова И. И., Скворцович Е. Г., Болдырев А. А., Пантелеева Н. С.*  $^{18}\text{O}$ -обмен в ходе гидролиза АТФ- и *n*-нитрофенилфосфата  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазой из мозга быка. — *Биохимия*, 1977, 42, 2035—2038.
  22. *Кулиева Н. В., Красовская И. Е., Кудинов С. А., Пантелеева Н. С.* Реакции изотопного обмена кислорода неорганического фосфата в системе плазматических мембран синапсом. — *Биохимия*, 1977, 42, 1052—1055.
  23. *Kanazawa T., Boyer P. D.* Occurrence and characteristics of a rapid exchange of phosphate oxygens catalyzed by sarcoplasmic reticulum vesicles. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 3163—3172.
  24. *Скворцович Е. Г., Сырцова Л. А., Узенская А. М., Тертышная И. И.* Изотопный обмен кислорода ( $^{18}\text{O}$ - $\text{P}=\text{H}_2\text{O}$ ) в системе нитрогеназы *Azotobacter vinelandii*. — Докл. АН СССР, 1979, 244 (1), 241—244.
  25. *Литвинштейн Г. И., Пантелеева Н. С., Скворцович Е. Г.* и др. О роли АТФ в функционировании нитрогеназы. — *Мол. биол.* В печати.
  26. *Wolcott P. G., Boyer P. D.* The reversal of the myosin and actomyosin ATPase reactions and the free energy of ATP binding to myosin. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, 57, 709—716.
  27. *Dahms A. S., Boyer P. D.* Occurrence and characteristics of  $^{18}\text{O}$ -exchange reaction catalyzed by sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 248, 3155—3163.
  28. *Красовская И. Е., Кулиева Н. В., Данилова В. М., Пантелеева Н. С.*  $^{18}\text{O}$ -обменные реакции, катализируемые миозином из гладких мышц кишечника теленка. — *Биохимия*, 1973, 42, 1104—1109.

## Часть вторая

# ГОРМОНЫ, ПРОСТАГЛАНДИНЫ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ В СРЕДЕ

УДК 612.173.1.015.12:577.152.361].014.46:612.452.018

## РАЗДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА КОМПОНЕНТОВ КАТЕХОЛАМИНОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

А. Г. ГИЛМАН (A. G. GILMAN), П. С. ШТЕРНВЕЙС (P. C. STERNWEIS),  
Э. С. ХАУЛЕТТ (A. C. HOWLETT), Д. К. НОРТАП (J. K. NORTHUP)  
И М. СМАЙГЕЛЬ (M. SMIGEL) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

Гормочувствительная аденилатциклазная система является главным механизмом передачи и усиления химического сигнала внутрь клетки. Несмотря на то что связанные с мембранами и растворимые аденилатциклазы интенсивно изучаются около 20 лет, более фундаментальная информация о количестве и природе компонентов этой ферментной системы стала поступать только в течение последних нескольких лет. Некоторые методические трудности резко затрудняют изучение аденилатциклазы. Главной трудностью является то, что регуляция ферментативной активности аденилатциклазы гормонами наблюдается на мембранных препаратах, тогда как очистка компонентов этой системы должна, конечно, проходить в растворе. Кроме того, интересующие нас белки весьма лабильны и присутствуют в мембранах в «следовых» количествах (необходима очистка примерно в 10 000 раз). Наконец, существуют только два параметра, значение которых можно оценивать на входе и выходе системы, — связывание гормона и синтез цАМФ. Таким образом, пока невозможно априорно предложить метод определения гипотетических промежуточных компонентов этой системы.

Наша стратегия преодоления этих трудностей состояла в сочетании последовательного разделения компонентов гормочувствительной аденилатциклазы с реконструкцией их на соответствующим образом выбранной (освобожденной от таких компонентов) акцепторной мембране; реконструкция должна восстанавливать первоначальную способность системы отвечать на гормон.



Первая система, которую мы использовали, S49 лимфома мышей, была выбрана из-за уникального свойства: цАМФ является цитостатиком для этих клеток. Это важное наблюдение, сделанное Tomkins и соавт. [1], было быстро использовано для выделения и характеристики генетических вариантов, которые отличались по способности отвечать на цАМФ или его синтезировать [2]. Клетки, относящиеся к генетическому варианту второго типа, который представлял для нас значительный интерес, были первоначально выделены Воигне и соавт. [3]. В этих клетках активность аденилатциклазы не была обнаружена ( $\text{сус}^-$ ), хотя они имели нормальное количество  $\beta$ -адренергических рецепторов [4]. Дополнительный вариант клеток, выделенных недавно, содержит как рецептор к гормонам, так и аденилатциклазу, ферментативная активность которой чувствительна к негормональным стимуляторам (гуаниновые нуклеотиды и ионы фтора) и нечувствительна к гормонам. Эти клоны были обозначены как несопряженные (UNC) [5].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источники клеточных культур, которые были использованы в этой работе, и методы культивирования опубликованы ранее [6, 7]. Фенотипы обсуждаемых клонов приведены в табл. 12.

ТАБЛИЦА 12

ФЕНОТИПЫ ЛИНИЙ КЛЕТОК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОПЫТАХ ПО РЕКОНСТРУКЦИИ

Клетки	Источник	Фенотип*
S49 — дикий тип	Лимфома мышечная	$R_{\beta}^+R_p^+G/F+C^+$
HC-1	Гепатомы крыс	$R_{\beta}^+R_p^-G/F+C^-$
S49 $\text{сус}^{-**}$	Лимфома мышей	$R_{\beta}^+R_p^+UNCG/F-C^+$
S49 UNC**	То же	$R_{\beta}^+R_p^+UNCG/FC^+$
B82	Клетки мышей L	$R_{\beta}^-R_p^+G/F+C^+$

\*  $R^+$ ,  $G/F^+$  и  $C^+$  означают соответственно присутствие  $\beta$ -адренергических ( $\beta$ ) и простагландиновых (р) рецепторов, регуляторного компонента G/F, необходимого для проявления фтор- и гуанилстимулированной аденилатциклазной активности, и каталитический компонент аденилатциклазы (C). Если в линии клеток отсутствовало сопряжение рецепторов и аденилатциклазы, они обозначались UNC, что нельзя объяснить отсутствием известного компонента (см. текст).

\*\* Наличие рецепторов для простагландина  $E_1$  в клетках типа  $\text{сус}^-$  и UNC не доказано, но предполагается на основании опытов по реконструкции.

Относительно очищенные плазматические мембраны выделяли в ступенчатом градиенте сахарозы [6]. Аденилатциклазу солиubilizировали, используя луброл 12A9 [8] или холат натрия [9]. Активности аденилатциклазы определяли радиометрическим методом с применением  $[\gamma^{32}P]$  АТФ [6, 10]. Связывающие характеристики  $\beta$ -адренергических рецепторов определяли с помощью

высокоспецифичного  $\beta$ -адренергического антагониста —  $[^{125}\text{I}]$  йодоксибензиллиндолола [11, 12]. Реконструкция гормонстимулированной и других активностей аденилатциклазы с экстрактами, приготовленными с помощью луброла 12A9, осуществляли простым смешиванием экстракта с мембранами [8]; при использовании экстрактов холата процедура проведения экспериментов по реконструкции была более сложной [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Разделение $\beta$ -адренергического рецептора и аденилатциклазы

Хотя изучение кинетики функционирования аденилатциклазной системы давно показало, что связывающие и каталитические места этой системы располагаются на разных белках (см. обзор [13]), биохимическое разделение аденилатциклазы и  $\beta$ -адренергического рецептора было проведено совсем недавно [14, 15]. Нага и соавт. [15], используя гель-фильтрацию и градиентное центрифугирование, определили гидродинамические параметры для этих белков (табл. 13). В экспериментах перед солюбилизацией

ТАБЛИЦА 13

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ  $\beta$ -АДРЕНЕРГИЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ \*

	$\beta$ -адренорецептор	Gpp(NH) $\gamma$ -обработанная аденилатциклаза	C	G/F
Радиус Стокса, нм	$6,4 \pm 0,03$	$7,1 \pm 0,04$	$7,1 \pm 0,10$	$6,6 \pm 0,14$
$S_{20w}$ (S)	$3,1 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,27$	$4,8 \pm 0,21$
Фрикционное соотношение	1,8	1,6	1,8	1,8
Молекулярная масса (только белка)**	$0,75 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$
Связанный детергент, моль/моль белка**	(0,68—0,85)	(2,2—2,8)	(1,8—2,2)	(1,2—1,5)
Связанный детергент, моль/моль белка**	100	80	40	35
	(80—110)	(20—120)	(0—70)	(10—55)

\* Данные получены методами гель-фильтрации и градиентного ультрацентрифугирования (в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$ ) в присутствии луброла 12A9. Параметры были вычислены согласно Нага и др. [15].

$\beta$ -адренорецептор, Gpp(NH) $\gamma$ , обработанная аденилатциклаза и G/F получены из клеток типа S49, C — из клеток типа sus-S49. Мембраны были растворены в луброле 12A9. Значения были подсчитаны на основе предположения о том, что парциальный удельный объем белков — 0,735 мл/г и луброла 12A9 (0,958 мл/г).

\*\* Значения в скобках получены, исходя из предположения, что парциальный удельный объем белка составляет 0,71 или 0,76.

пней с детергентом аденилатциклазы была активирована с помощью аналога ГТФ-гуанилилимидифосфата Gpp(NH)p. Такая обработка активирует фермент необратимо и стабилизирует ферментативную активность. Механизм этих процессов неизвестен. Гидродинамические параметры для тех компонентов аденилатциклазы, о которых речь пойдет ниже, также даны в табл. 13.  $\beta$ -адренергический рецептор и аденилатциклаза могут быть разделены и генетически. Как указывалось выше, клетки клона сус<sup>-</sup>S49 сохраняют рецепторную активность при отсутствии ферментативной активности. При простом рассмотрении клетки гепатомы НТС (клон НС-1, табл. 12) имеют подобный фенотип [16, 17].

### Реконструкция гормоночувствительной аденилатциклазной активности в клетках сус<sup>-</sup>S49

Мы предприняли попытку реконструировать гормоночувствительную аденилатциклазную систему, введя растворимый фермент (не обработанный с Gpp(NH)p и свободный от рецептора) в нативную биологическую мембрану, которая содержит рецепторы [8]. Плазматическая мембрана клеток лимфомы сус<sup>-</sup>S49 была выбрана в качестве мембранно-связанного  $\beta$ -адренергического рецептора. Плазматические мембраны клеток лимфомы мышей (B82 — см. табл. 12) содержат аденилатциклазу, свободную от  $\beta$ -адренергических рецепторов [17]. Из рис. 66 видно, что смешивание растворимой аденилатциклазы (луброловый экстракт) плазматических мембран клеток B82 с плазматическими мембранами клеток сус<sup>-</sup>S49 приводит к появлению катехоламинстимулируемой аденилатциклазной активности. Стимуляция аденилатциклазы изопротеренолом зависит от соотношения количества экстракта из мембран клеток B82 и мембран клеток сус<sup>-</sup>S49 и обнаруживает определенную фармакологическую специфичность для  $\beta$ -адренергического ответа. Реконструкция может быть также проведена при использовании детергентных экстрактов других мембран (как клеток типа S49, так и тканей). Успех таких реконструкций также зависит от присутствия  $\beta$ -адренергических рецепторов в акцепторных мембранах. Основываясь на видимом фенотипе клеток сус<sup>-</sup>S49 и B82, мы вправе предположить, что при реконструкционного экстракта с  $\beta$ -адренергическим рецептором в мембранах клеток сус<sup>-</sup>S49.

### Разделение нескольких компонентов аденилатциклазы

Если это простое объяснение верно, тогда аденилатциклазная активность реконструированной смеси должна реагировать на любые воздействия, приводящие к уменьшению активности

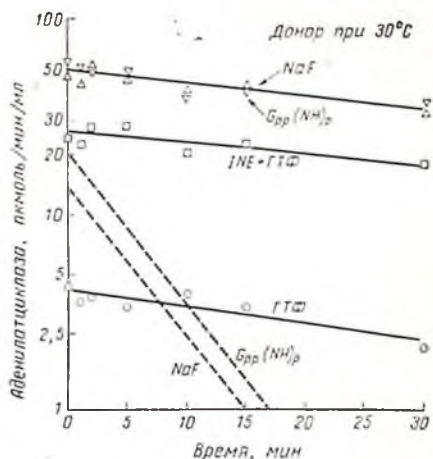
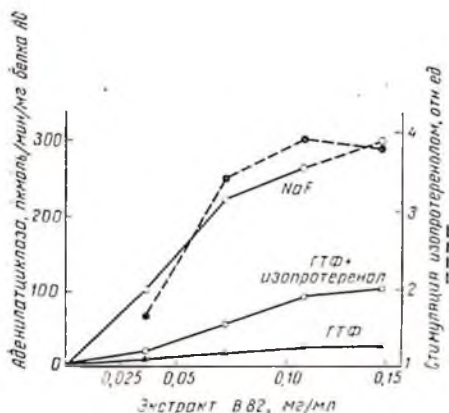


Рис. 66. Реконструкция катехоламинстимулированной аденилатциклазной активности из мембран клеток сус-S49 и экстракта, обработанного дубролом из мембран клеток В82. Аденилатциклазную активность в реконструированных смесях определяли в присутствии ГТФ (100 мкМ), ГТФ плюс изопротеренол (1 мкМ), или NaF (10 мМ). Стимуляция изопротеренолом, превышающая стимуляцию ГТФ, показана также пунктирной линией. В этих экспериментах увеличивающиеся количества экстракта мембран клеток В82 смешивали с фиксированным количеством мембран клеток сус- (Воспроизводится из [8] с согласия Proc. natl. Acad. Sci. USA).

Рис. 67. Реконструкция гормоночувствительной аденилатциклазы смесью мембран клеток типа сус- с термоинактивированным экстрактом мембран типа S49. Детергентный экстракт (дуброл 12A9) мембран клеток S49 нагревали при 30 °С в течение времени, указанного на абсциссе, охлаждали и смешивали с мембранами сус-. NaF и Gpp(NH)β-стимулированные активности аденилатциклазы в экстракте (перед реконструкцией) показаны пунктирной линией. Активности реконструированных смесей определены в присутствии ГТФ, изопротеренола плюс ГТФ NaF или Gpp(NH)β. (Воспроизводится из [7] с согласия J. Biol. Chem.).

экстракта-донора. Данные на рис. 67 показывают, что это не так. Если экстракт-донор (в этом эксперименте — экстракт мембран клеток типа S49) нагреть до 30° С перед реконструкцией, то его аденилатциклазная активность резко снизится ( $t_{1/2} = 4$  мин, пунктирная линия рис. 67). Однако если обработанный таким образом экстракт добавить к мембранам клеток типа сус-S49, то аденилатциклазная активность такого реконструированного препарата уменьшится весьма незначительно (см. рис. 67). Следует отметить, что добавление полностью неактивного экстракта (прогретого в течение 30 мин) к мембранам клеток сус-S49 реконструирует базальную аденилатциклазную активность в такой же степени, как ионы фтора, Gpp(NH)β и катехоламины (аналогичные эксперименты, проведенные с экстрактами аденилатциклаза, пик-

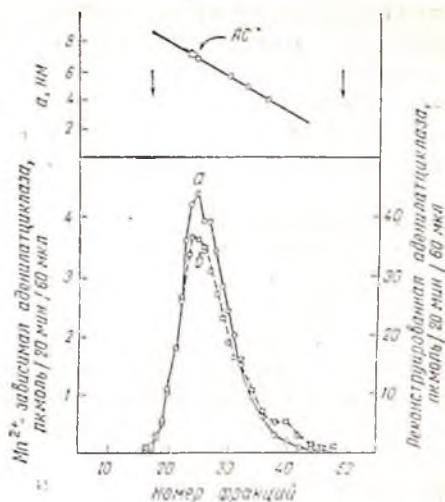
тивированных обработкой N-этилмалеимидом, дали такие же результаты). Реконструкция базальной и фтор- или Gpp(NH)pp-стимулированной активности также наблюдалась, если нагретый (или инактивированный N-этилмалеимидом экстракт мембран клеток типа S49 или B82 смешивали с детергентным экстрактом мембран клеток типа сус<sup>-</sup>S49, причем активность этой системы можно было измерить в растворе с детергентом [18].

Приведенные выше данные (и некоторые другие эксперименты: см. [7, 8]) позволяют предполагать, что по меньшей мере два фактора необходимы для проявления MgATФ-зависимой активности аденилатциклазы. Мембраны клеток типа сус<sup>-</sup>S49 или луброльный экстракт мембран этих клеток содержат термолабильный и N-этилмалеимидочувствительный фактор, который инактивируется прогреванием до 30° С или обработкой сульфидрильным реагентом. Эта гипотеза подкрепляется тем фактом, что способность экстракта клеток типа сус<sup>-</sup>S49 реконструировать ферментативную активность уменьшается при 30° С такой же кинетикой, как и общая активность аденилатциклазы мембран клеток типа S49. Реконструирующий фактор из мембран клеток типа сус<sup>-</sup>S49 обнаруживает такую же чувствительность к N-этилмалеимиду, как и аденилатциклаза мембран клеток S49. Оба фактора, которые необходимы для реконструкции любой аденилатциклазной активности (термолабильный — из мембран клеток типа сус<sup>-</sup>S49 и термостабильный — из экстракта мембран клеток типа S49), по-видимому, являются белками, так как они инактивируются различными протеазами и N-этилмалеимидом [7, 18].

### Идентификация термолабильного фактора из клеток типа сус<sup>-</sup>S49

Так как для проявления аденилатциклазной активности необходимы два белка, можно предположить, что один из них выполняет каталитическую функцию, а второй обеспечивает регуляцию активности этой системы. Поскольку мы хотели прежде всего выяснить функции обнаруженных белков, для нас представляло интерес обнаружение того факта, что луброльный экстракт из клеток типа сус<sup>-</sup>S49 способен лучше катализировать синтез, если субстратом является MnATФ, а не MgATФ [7]. Существуют строгие доказательства, что термолабильный белок из мембран клеток типа сус<sup>-</sup>, который необходим для реконструкции MgATФ-зависимой активности аденилатциклазы, является тем же белком, который способен синтезировать цАМФ, если субстратом является MnATФ. Мы пришли к выводу, что белок из мембран клеток типа сус<sup>-</sup>, который необходим для реконструкции, является каталитической субъединицей аденилатциклазы, поэтому мы обозначили его как С. Данные в поддержку этой гипотезы опубликованы ранее [7]. Наиболее важный из этих экспериментов показы-

Рис. 68. Гель-фильтрация каталитической субъединицы (С) и MnATФ-зависимой аденилатциклазы из мембран клеток типа сус-S49. Активность аденилатциклазы определяли или в присутствии 10 мМ MnCl<sub>2</sub> (а), или после реконструкции с термоинактивированным экстрактом мембран клеток S49 в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> плюс 0.1 мМ Gpp(NH)р (б). Верхний рисунок — калибровочный график для определения радиуса Стокса. Стрелки показывают объем элюции голубого декстрана (левая) и 2,4-динитрофенилглицина (правая). (Воспроизводится из [7] с согласия J. biol. Chem.).



вает, что оба белка: и каталитическая субъединица и регуляторная фракционируются параллельно и при гель-фильтрации и при градиентном центрифугировании (рис. 68). Эти исследования также позволили вычислить гидродинамические параметры для каталитической субъединицы (см. табл. 13).

### Свойства и частичная очистка термостабильного компонента аденилатциклазы

Минимальная роль этого компонента состоит в том, что он должен сообщать каталитическому компоненту способность использовать MgATФ в качестве субстрата. Кроме того, поскольку MnATФ-зависимая активность мембран клеток типа сус-S49 не стимулируется ионами фтора, Gpp(NH)р или гормоном, для регуляции каталитической активности этими лигандами, видимо, необходим более термостабильный белок. Опыты, описанные ниже, указывают, что этот компонент аденилатциклазы является местом действия гуаниновых нуклеотидов и ионов фтора; по этой причине мы обозначили его как G/F.

Данные, представленные выше, указывают, что регуляторный белок G/F может быть отделен от каталитической субъединицы С инкубацией (при 30—37° С) экстрактов плазматических мембран из клеток типов S49 или B82. Кроме того, в клетках типа сус-S49 белок С отделяется от белка G/F с помощью генетических манипуляций. Эти наблюдения могут быть обобщены, если: 1) удастся разделить белки G/F и С другими методами и в других тканях; 2) удастся выделить фенотипически клоны клеток, дефицитные по аденилатциклазе, которые, не имея каталитического компонента, сохраняют регуляторный. Следует отметить, что пу-

тем нагревания плазматических мембран разных органов [7] уже проведено разделение регуляторного G/F и каталитического С-компонента аденилатциклазы (в качестве объекта использовали мозг крысы, печень крысы и кролика и эритроциты голубя). Белок G/F может быть отделен от белка С и химическим способом, так как каталитическая субъединица примерно в 100 раз более чувствительна к N-этилмалеимиду, чем регуляторная. Этот химически выделенный регуляторный белок по своей способности реконструировать  $Mg^{2+}$ -зависимую активность аденилатциклазы в мембранах клеток типа сус<sup>-</sup> не отличается от белка G/F, выделенного с помощью нагревания. В настоящее время ведутся работы по разделению регуляторной и каталитической субъединиц аденилатциклазы, выделенной из различных типов клеток. Это осложняется лабильностью каталитического компонента.

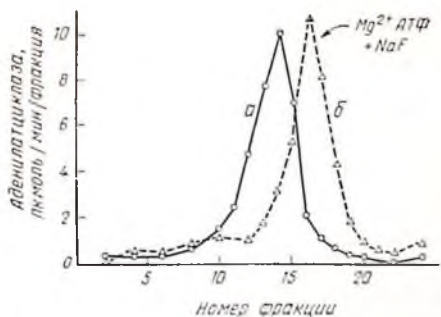
Клон клеток гепатомы НС-1, который характеризуется почти полной потерей аденилатциклазной активности, представляет собой пример генетического отделения регуляторного белка. Детергентный экстракт мембран клеток НС-1 не обнаруживает аденилатциклазной активности в присутствии  $MnATP$  или  $MgATP$ . Смешивание его с мембранами клеток типа сус<sup>-</sup> вызывает появление фтор-,  $Gpp(NH)p$ - или гормонстимулированной ферментативной активности [7].

Гидродинамические параметры этого регуляторного белка, приведенные в табл. 13, не зависели от способа, с помощью которого этот белок был отделен от С — термическая обработка, инкубация с N-этилмалеимидом или генетический метод (НС-1).

Мы надеялись, что сравнение физических свойств регуляторного и каталитического белков,  $Gpp(NH)p$ -активированной (стабилизированной) аденилатциклазы даст информацию о механизмах регуляции каталитической активности, но до сих пор наши надежды не оправдались. Оказалось, что молекулярная масса  $Gpp(NH)p$ -активированного фермента не является простой суммой молекулярных масс С и G/F единиц. Наблюдаемые различия молекулярных масс фермента и его составляющих могут быть обусловлены не только (и не столько) использованием грубого экстракта мембран, при котором возможны грубые ошибки в расчетах. Эти различия могут объясняться также сложными молекулярными процессами, происходящими при активации и стабилизации аденилатциклазы с помощью  $Gpp(NH)p$ , или указывать на самодиссоциацию G/F и С-субъединиц в детергентном экстракте.

Инкубация G/F с  $Gpp(NH)p$  или с фтором приводит к «активации» белка и к изменению его физических свойств. Это свидетельствует, что регуляторная субъединица G/F является местом действия этих лигандов. Так, когда G/F являлся местом  $Gpp(NH)p$  и  $Mg^{2+}$ , а смесь разводили перед добавлением С [так что концентрация  $Gpp(NH)p$  была ниже, чем требовалось для активации], ферментативная активность была эквивалентна

Рис. 69. Седиментация G/F в градиенте плотности сахарозы в отсутствие (а) или присутствии (б) MgATФ плюс NaF. Лубричный экстракт мембран клеток S49, который инкубировали при 37 °С 15 мин для инактивации G, был затем инкубирован при 30 °С в течение 5 мин в отсутствие или присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ и 10 мМ NaF. Экстракты наносили на линейный градиент сахарозы (5–20 %) и центрифугировали 15 ч при 48 000 об/мин в роторе SW 50.1 ("Beckman"). В аликвотах определяли активность G/F после реконструкции с мембранами клеток типа сус<sup>-</sup> в присутствии NaF. В отсутствие лигандов коэффициент седиментации составлял 4,8S, а в их присутствии — 3,8S.



Gpp(NH)p-активированному состоянию, наблюдаемому первоначально. Подобная экспозиция С с гуаниновым нуклеотидом не имела эффекта. Аналогичные результаты с фтором дали такой же результат. Однако для активации G/F фтором требовались также Mg<sup>2+</sup> и нуклеотид. Активация регуляторной субъединицы G/F с помощью Gpp(NH)p или фтора + АТФ была обратима. Активированное состояние (и, возможно, существование лиганд) прекращается через несколько минут после окончания экспозиции с фтором; обратный эффект Gpp(NH)p меньше.

Экспозиция регуляторной субъединицы с фтором и АТФ или Gpp(NH)p вызывает изменение свойств этого белка. В таком состоянии G/F легче внедряется в мембраны клеток типа сус<sup>-</sup> [19] и его коэффициент седиментации уменьшается (рис. 69). Молекулярная масса регуляторного белка в присутствии Gpp(NH)p и ионов фтора с АТФ уменьшается на 40 000. Однако изменение массы белка полностью обратимо даже после попыток удалить гипотетический компонент, который может диссоциировать во время обработки с активирующими лигандами. В настоящее время наши знания о механизме этих изменений недостаточны.

Поскольку регуляторная субъединица имеет значительную стабильность, мы сконцентрировали наши попытки по очистке компонентов аденилатциклазы именно на этом белке. Мы очистили этот регуляторный белок из печени кролика в несколько тысяч раз (относительно активности очищенных мембран) с высоким выходом (около 25%). Удельная активность препарата в этой стадии, оцененная по реконструкции с мембранами клеток типа сус<sup>-</sup>, равнялась 1–2 мкмоль/мин на 1 мг белка. При очистке использовали хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе, ультрагеле АсА34, гептаагарозе, гидроксилпатите и ГТФ-сефарозе [20].



## Реконструкция мембран клеток типа $\text{сус}^-$ и UNC с холатом натрия

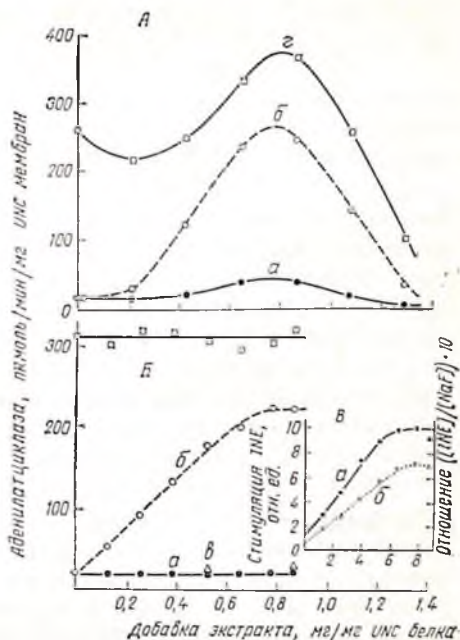
Растворение мембран клеток типа S49 с холатом натрия приводит к резкому уменьшению определяемой аденилатциклазной активности мембранного экстракта, причем остаточная активность быстро разрушается при нагревании до  $25^\circ\text{C}$ . При этом активность регуляторного белка (G/F) в экстракте не уменьшается. Это свойство широко используется для реконструкции мембран клеток типа  $\text{сус}^-$  и UNC (рис. 70), как детально описано [9]. Если при этой процедуре общая концентрация добавленного детергента остается постоянной, титрование увеличивающимися количествами активного экстракта вызывает почти линейное увеличение реконструированной (стимулируемой гормонами) активности, которая достигает максимума при оптимальном уровне добавленного экстракта.

Мембраны, которые были реконструированы по этой методике, функционально не отличались от мембран клеток типа S49. Так, реконструированная аденилатциклазная активность в этих мембранах стимулировалась  $\beta$ -адренергическими агонистами, PGE<sub>1</sub>, аналогами гуаниновых нуклеотидов и ионами фтора. Удельная активность фермента и зависимость этой активности от концентрации активирующих лигандов являются обычными.  $K_D$  при связывании изопротеренола с ресопряженным  $\beta$ -адренорецептором, отношение этой  $K_D$  к значению  $K_{\text{акт}}$  (см. ссылки [13], [20]) и способность гуаниновых нуклеотидов вызывать агонистспецифические изменения рецепторной активности — все эти свойства реконструированных мембран клеток типа  $\text{сус}^-$  и UNC [9] не отличались от свойств мембран клеток типа S49.

Используя указанные выше методические подходы для определения факторов, необходимых для реконструкции UNC мембран, мы попытались определить, почему аденилатциклаза мембран клеток UNC не стимулируется гормональными лигандами [Gpp(NH)p и ионами фтора] и не отвечает на катехоламины. В настоящее время мы можем сказать, что этот дефект устраняется добавлением одного или более факторов к мембранам клеток UNC, причем решающий фактор чувствителен к температуре и инактивируется N-этилмалеимидом и трипсином [9]. Этот фактор неотличим от регуляторной субъединицы по термолабильности, чувствительности к N-этилмалеимиду и по коэффициенту седиментации. Более того, большинство доступных нам очищенных фракций было полностью активно при реконструкции UNC мембран. И, наконец, следует отметить, что клетки  $\text{сус}^-$ , т. е. дефицитные по G/F, и клетки UNC некомплементарны *in vitro*, следовательно, эти дефекты мембран перекрываются. Мы предлагаем два вероятных объяснения дефекта мембранной аденилатциклазной системы клеток типа UNC. Во-первых, могут существовать два отдельных компонента — регуляторная субъеди-

Рис. 70. Реконструкция мембран клеток UNC с холатным экстрактом клеток типа S49.

а — мембраны клеток UNC смешивали с увеличивающимися количествами экстракта и реконструировали, как описано в [9]; б — общее количество экстракта добавленного при реконструкции, поддерживали на постоянном уровне добавлением активного экстракта в увеличивающихся количествах с экстрактом, инактивированным при 60 °С в течение 20 мин в уменьшающихся количествах; вставка на рис. «б» — пересчитанные данные большого графика. Определение аденилатциклазной активности проводили в присутствии 50 мкМ ГТФ (а, б, в), 2 мкМ изопротеренола (б, в), 2 мкМ изопротеренола (в) или 10 мМ NaF (г). (Воспроизводится из [9] с согласия J. Biol. Chem.).



лица и фактор, отсутствующий в мембранах клеток типа UNC. Если это так, то весьма вероятно, что новый фактор, необходимый для реконструкции UNC, может быть крепко связан с регуляторной субъединицей G/F, относительно мал и зависит от нее при внедрении в мембрану. Другая возможная гипотеза: регуляторная субъединица G/F подвергается посттрансляционной модификации; дефект в компоненте, необходимой для такой ковалентной модификации G/F или ее реверсии, может действительно объяснить разобщенный фенотип (UNC).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данном сообщении мы попытались оценить и обсудить значение результатов, показывающих взаимоотношения между компонентами аденилатциклазной системы, которые были описаны как нами, так и другими авторами. Paeuffer [20] провел на ГТФ-сефарозе аффинную хроматографию мембран эритроцитов голубя, растворенных в детергенте. Аденилатциклаза, которая проходила через колонку, имела уменьшенную Gpp(NH)p и фторстимулированную активность. У белка, который элюировался с сефарозы раствором ГТФ или Gpp(NH)p, фторстимулированная активность возвращалась к норме. Этот белок имел молекулярную массу около 42 000 (данные электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Резонно предположить взаимосвязь этого белка и регуляторной субъединицы аденилат-

циклазы G/F, хотя, по нашим данным, нативный белок G/F имеет несколько большие размеры.

Cassel и Selinger [22, 23], которые описали ГТФ-азную активность мембран эритроцитов птиц, стимулирующихся  $\beta$ -адренергическими агонистами, предположили, что связывание ГТФ (или освобождение ГДФ) — решающая стадия ферментативной активации, а гидролиз ГТФ необходим для возвращения активности к базальному уровню. ГТФ-азная активность, стимулируемая гормонами, подавляется холерным токсином, и обработанный токсин фермент активируется ГТФ так же, как нативный фермент активируется Gpp(NH)p [24]. Как показывают эксперименты, проведенные Moss и Vaughan [25], Gill и Meren [26], холерный токсин катализирует АДФ-рибозилирование некоего мембранно-связанного белка, что необходимо для регуляции аденилатциклазы; показано также, что субстратом является ГТФ связывающий белок [26, 27]. Наши данные [19] и данные Johnson и соавт. [28] свидетельствуют, что активность регуляторного белка G/F модифицируется при обработке холерным токсином, и таким образом G/F может выполнять функцию субстрата. Можно предположить, что регуляторный белок G/F имеет субъединицу с молекулярной массой 42 000, которая является связывающим местом для ГТФ и местом АДФ-рибозилирования катализируемым холерным токсином. Эта субъединица, по-видимому, обеспечивает по крайней мере часть ГТФ-азной активности, необходимой для регуляции аденилатциклазы. Для доказательства этого необходима полная очистка регуляторного белка (G/F) аденилатциклазы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daniel V., Litwack G., Tomkins C. M. Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and the isolation of resistant variants.—Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 76—79.
2. Coffino P., Bourne H. R., Freidrich U. et al. Molecular mechanisms of cyclic AMP action: a genetic approach.—In: Recent Progress in Hormone Research /Ed. R. O. Greep Acad. Press, New York, 1976, 32, 669.
3. Bourne H. R., Coffino P., Tomkins G. M. Selection of a variant lymphoma cell deficient in adenylate cyclase.—Science, 1975, 187, 750—752.
4. Insel P. A., Maguire M. E., Gilman A. G. et al. Beta adrenergic receptors and adenylate cyclase: products of separate genes?—Mol. Pharmacol., 1976, 12, 1062—1069.
5. Haga T., Ross F. M., Anderson H. J., Gilman A. G. Adenylate cyclase permanently uncoupled from hormone receptors in a novel S49 lymphoma cell variant.—Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 2016—2020.
6. Ross E. M., Maguire M. E., Sturgill T. W. et al. The relationship between the  $\beta$ -adrenergic receptor and adenylate cyclase. Studies of ligand binding and enzyme activity in purified membranes of S49 lymphoma cells.—J. biol. Chem., 1977, 252, 5761—5775.
7. Ross E. M., Howlett A. C., Ferguson R. M., Gilman A. G. Reconstitution of hormone-sensitive adenylate cyclase activity with resolved components of the enzyme.—J. biol. Chem., 1978, 253, 6401—6412.
8. Ross F. M., Gilman A. G. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interaction of solubilized components with receptor-replete membranes.—Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3715—3719.

9. Sternweis P. C., Gilman A. G. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylyl cyclase: reconstitution of the uncoupled (UNC) variant of the S49 lymphoma cell.—*J. Biol. Chem.* In press.
10. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. A highly sensitive adenylyl cyclase assay.—*Anal. Biochem.*, 1974, 58, 541—548.
11. Aurbach G. D., Fedak S. A., Woodard C. J. et al. Beta Adrenergic receptors: stereospecific interaction of iodinated beta blocking agents with high affinity sites.—*Science*, 1974, 186, 1223—1224.
12. Maguire M. F., Wiklund R. A., Anderson H. J., Gilman A. G. Binding of [<sup>125</sup>I] iodohydroxybenzylpindolol to putative  $\beta$ -adrenergic receptors of rat glioma cells and other cell clones.—*J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 1221.
13. Maguire M. E., Ross E. M., Gilman A. G.  $\beta$ -Adrenergic receptor: ligand binding properties and the interaction with adenylyl cyclase.—In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research* /Eds. P. Greengard, G. A. Robinson. Raven Press, New York, 1977, 8, 1—83.
14. Limbird L. E., Lefkowitz R. J. Resolution of  $\beta$ -adrenergic receptor binding and adenylyl cyclase activity by gel exclusion chromatography.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 799—802.
15. Haga T., Haga K., Gilman A. G. Hydrodynamic properties of the  $\beta$ -adrenergic receptor and adenylyl cyclase from wild type and variant S49 lymphoma cells.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 5776—5782.
16. Graner D., Chase L. R., Aurbach G. D., Tomkins G. M. Tyrosine aminotransferase: enzyme induction independent of adenosine 3',5'-monophosphate.—*Science*, 1968, 162, 1018—1020.
17. Brunton L. L., Maguire M. E., Anderson H. J., Gilman A. G. Expression of genes for metabolism of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in somatic cells,  $\beta$ -Adrenergic and PGF<sub>1</sub> receptors to parental and hybrid cells.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 1293—1302.
18. Ross E. M., Gilman A. G. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 6966—6969.
19. Howlett A. C., Sternweis P. C., Macik B. A. et al. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylyl cyclase: association of a regulatory component of the enzyme with membranes containing the catalytic protein and  $\beta$ -adrenergic receptors.—*J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 2287—2295.
20. Pfeuffer T. GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylyl cyclase activity.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 7224—7234.
21. Howlett A. C., Van Arsdale P. M., Gilman A. G. Efficiency of coupling between the beta adrenergic receptor and adenylyl cyclase.—*Mol. Pharmacol.*, 1978, 14, 531—539.
22. Cassel D., Selinger Z. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey membranes.—*Biochim. biophys. Acta*, 1976, 452, 538—555.
23. Cassel D., Selinger Z. Mechanism of adenylyl cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 3307—3311.
24. Levinson S. L., Blume A. J. Altered guanine nucleotide hydrolysis as basis for increased adenylyl cyclase activity after cholera toxin treatment.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3766—3774.
25. Moss J., Vaughan M. Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2455—2457.
26. Gill D. M., Merin R. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylyl cyclase.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3050—3054.
27. Cassel D., Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylyl cyclase system.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2269—2273.
28. Johnson G. L., Kaslow H. F., Bourne H. R. Reconstitution of cholera toxin-activated adenylyl cyclase.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3113—3117.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ, ПРОТЕИНКИНАЗЫ И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

Е. С. СЕВЕРИН, Т. В. БУЛАРГИНА, Н. Н. ГУЛЯЕВ,  
М. Н. КОЧЕТКОВА, В. Л. ТУНИЦКАЯ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время все большее внимание уделяется исследованию роли циклических нуклеотидов в регуляции клеточного метаболизма, причем особое значение придается изучению механизма действия ферментов, участвующих в обмене циклического аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ) и в проявлении его биологического действия.

Метаболические превращения цАМФ включают два фермента — аденилатциклазу, фермент биосинтеза цАМФ, и фосфодиэстеразу — фермент, расщепляющий цАМФ до 5'-АМФ. В результате воздействия гормона на соответствующий рецепторный белок происходит активация каталитического компонента аденилатциклазы, катализирующего образование цАМФ из АТФ.

Биологическое действие цАМФ реализуется через активацию им особого класса ферментов — цАМФ-зависимых протеинкиназ. При связывании цАМФ с регуляторной субъединицей протеинкиназы происходит освобождение активной каталитической субъединицы фермента, которая катализирует фосфорилирование ряда функционально важных белков, что может существенно отразиться на характере функциональной активности клетки.

Необычайно широкое участие цАМФ в регуляции самых разнообразных клеточных процессов [1] и определяет тот интерес, который связан с изучением механизма действия и структуры активных центров аденилатциклазы, протеинкиназ и фосфодиэстеразы. Особое значение в исследованиях такого рода имеет использование аналогов АТФ и цАМФ, содержащих в составе своих молекул реакционно-способные группировки. Подобного типа соединения вследствие структурного сходства с АТФ или цАМФ обладают повышенным сродством к активному или регуляторному центру, а за счет наличия активных группировок способны ковалентно присоединяться к указанным участкам ферментов. Такое взаимодействие является высокоизбирательным, что дает возможность изучать структуры активных центров ферментов, труднодоступных в гомогенном состоянии, как, например, фосфодиэстеразы, или вообще не полученных в нативном и гомогенном виде, например аденилатциклазы.

В настоящей работе приводятся данные по изучению структуры активных центров аденилатциклазы и протеинкиназы с по-

мощью аналогов АТФ, а также активного центра фосфодиастеразы с помощью аналогов цАМФ. Большинство из использованных соединений содержало в своем составе активные группировки, способные ковалентно блокировать функциональные группы фермента. Обсуждаются некоторые особенности строения АТФ-связывающих участков аденилатциклазы и протеникиназы, а также сходство и различие в структуре цАМФ-связывающих центров фосфодиастеразы и регуляторной субъединицы протеникиназы.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ С АНАЛОГАМИ АТФ

Известно, что в клетках эукариот каталитический компонент аденилатциклазы прочно связан с плазматической мембраной клетки и легко инактивируется при очистке фермента. Отсутствие нативных и гомогенных препаратов аденилатциклазы не дает возможности проводить изучение аденилатциклазного комплекса на молекулярном уровне. Поэтому в последнее время все большее значение приобретают исследования, направленные на изучение структурно-функциональной природы отдельных компонентов данного комплекса.

Проведено изучение АТФ-связывающего участка солиобилизированной аденилатциклазы из сердца кролика с помощью синтезированных нами аналогов АТФ, имеющих функционально-активные группы в различных положениях молекулы [2—4]. Выбранные нами аналоги АТФ (табл. 14) можно разделить на три группы: соединения с замещением только по трифосфатной части молекулы АТФ (I—IX, XI и XII); соединения с замещением по положению С(8) пуринового кольца и с модификацией по три-

ТАБЛИЦА 14  
ИНАКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АНАЛОГОВ АТФ НА АКТИВНОСТЬ  
СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КРОЛИКА

Соединение	$K_i$ , мМ	Соединение	$K_i$ , мМ
I. $(BrCH_2CH_2) pA$	2,1*	X. $p(CH)pA-2'3'-O-isopropylidene$	0,19*
II. $(BrCH_2CH_2) pppA$	1,8*	$NHCOCH_2Br$	
III. $(BrCH_2CH_2) pppA$	0,5*	XI. $p(CH_2) pppA$	0,29*
IV. $(ClCH_2)pA$	2,2*	XII. $p(CH) pppA$	0,20*
V. $(ClCH_2) pppA$	1,7*	$NHCOCH_2Br$	
VI. $(ClCH_2) pppA$	0,19**	XIII. $p(CH_2) pppA-8-NH(CH_2)_6NHCOCH_2Cl$	0,91*
VII. $(ClCH_2CH_2O)pA$	1,0*	XIV. $pppA-8-NH(CH_2)_6NHCOCH_2Cl$	1,6**
VIII. $pp(CH_2)pA$	0,09*	XV. $pA-8-NH(CH_2)_2NHCOCH_2Cl$	1,9**
IX. $p(CH)pA$	0,42*	XVI. $pppA-8-Br$	1,8**
$NHCOCH_2Br$			

\* Препарат фермента с  $K_m=0,075$  мМ.

\*\* Препарат фермента с  $K_m=0,100$  мМ.

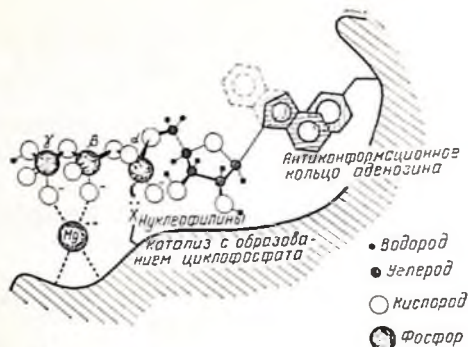


Рис. 71. Предполагаемая структура  $Mg^{2+}$ -АТФ комплекса в активном центре аденилатциклазы.

вое возрастание сродства к АТФ-связывающему участку фермента с увеличением числа атомов фосфора в молекуле, что свидетельствует о важном значении трифосфатного фрагмента АТФ для связывания с аденилатциклазой. Отсутствие необратимого ингибирования под действием аналогов XII и IX, имеющих галоидалькильный заместитель соответственно у  $\beta$ -,  $\gamma$  и  $\alpha$ ,  $\beta$ -метиленовых звеньев, может указывать: в первом случае на отсутствие функциональной группы фермента в области связывания  $\gamma$ -фосфата АТФ, а во втором — на такую конформацию фосфатного фрагмента IX (либо трифосфатного участка АТФ) в активном центре, при которой заместитель (либо  $\alpha$ ,  $\beta$ -мостиковый кислородный атом АТФ) направлен в противоположную сторону от каталитической группы. Кроме того, маловероятно присутствие какой-либо функциональной группы фермента в районе связывания 2'-ОН-группы остатка рибозы, поскольку соединение X, содержащее 2',3'-O-изопропилиденовую группировку, обладает высоким сродством к активному центру. Все 8-замещенные аналоги АТФ (XIII—XVI), имеющие преимущественно син-конформацию, проявили низкое сродство к АТФ-связывающему центру аденилатциклазы, из чего можно заключить, что он, по-видимому, более специфичен к анти-конформации субстрата.

На основании полученных результатов можно предположить такое строение  $Mg^{2+}$ -АТФ-комплекса в активном центре аденилатциклазы, при котором гидроксил при  $\alpha$ -атоме фосфора сближен с 3'-ОН-группой остатка рибозы;  $Mg^{2+}$  образует, по-видимому, комплекс с гидроксильными группами при  $\beta$ - и  $\gamma$ -атомах фосфора и располагается по ту же сторону трифосфатного фрагмента АТФ, что и гидроксильная группа  $\alpha$ -атома фосфора, которая в свою очередь направлена в противоположную от  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\beta$ ,  $\gamma$ -мостиковых кислородных атомов сторону (рис. 71).

фосфатной части (XIII—XVI) и соединенное с модифицированным рибозным кольцом и трифосфатным фрагментом (X). Обнаружено, что все изученные соединения, несмотря на наличие в их составе алкилирующих группировок, являлись обратимыми и конкурентными по отношению к АТФ ингибиторами аденилатциклазы (см. табл. 14).

Для соединений I—VI следует отметить отчетли-

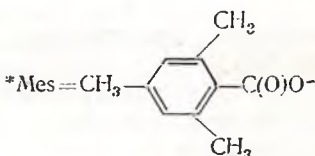
## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ПРОТЕИНАКИНАЗЫ С АНАЛОГАМИ АТФ

Строение активного центра цАМФ-зависимых протеинкиназ из скелетной мускулатуры в настоящее время мало изучено. Аналоги АТФ, использованные авторами для этой цели, не содержали активных групп в составе молекул [5, 6], что делало невозможным установление природы группы активного центра. Мы исследовали взаимодействие каталитической субъединицы протеинкиназы из грудной мышцы голубя с аналогами АТФ, которые уже упоминались ранее (см. табл. 14), либо специально были получены нами [7]. Выбранные аналоги АТФ были модифицированы по трифосфатному фрагменту АТФ, а большинство из них содержало реакционно-способные группировки в указанном участке молекулы (табл. 15 и 16, а также табл. 14).

ТАБЛИЦА 15

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АНАЛОГОВ АТФ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ЦАМФ-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНАКИНАЗЫ

Соединение	$K_i$ , мкМ
VIII. pp(CH <sub>2</sub> )pA	2,3
XI. p(CH <sub>2</sub> )ppA	500
I. (BrCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )pA	200
II. (BrCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )ppA	70
III. (BrCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )pppA	1000
IV. (ClCH <sub>2</sub> )pA	100
VI. (ClCH <sub>2</sub> )pppA	790
VII. (ClCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O)pA	70
XVII. (BrCH <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O)ppA	530
XVIII. (Mes)*pA АТФ	340 $K_s = 5$ мкМ



Было установлено, что в случае соединений I—IV, VI—VIII, XI, XVII и XVIII торможение являлось обратимым и конкурентным по отношению к АТФ, что указывало на специфичность связывания этих аналогов в активном центре каталитической субъединицы (см. табл. 15).

Как видно из табл. 15, в ряду аналогов I—III и IV, VI наибольшим сродством к активному центру фермента обладало соединение II, имеющее в своей молекуле два фосфатных остатка. Однако увеличение количества фосфатных остатков до трех с одновременным введением заместителя по  $\gamma$ -атому фосфора (соединения III и VI) приводило к падению сродства примерно в 10—



ТАБЛИЦА 16

АНАЛОГИ АТФ, НЕОБРАТИМО ИНГИБИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ  
КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ЦАМФ-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

Содержание	$k_{\text{каж}}, \text{мин}^{-1}$	Концентрация ингибитора, мМ
V. $(\text{ClCH}_2)\text{ppA}$	0,017	5,0
XX. $(p\text{-FO}_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{O})\text{pA}$	0,043	0,2
XXI. $(p\text{-FO}_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO})\text{A}$	0,019	0,5
XXII. $(m\text{-FO}_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO})\text{A}$	0,034	0,5
XIX. $(\text{Mes})\text{ppA}$	0,046	5,0
XII. $p(\text{CH})\text{ppA}$	0,027	5,0
$\text{NHCOCH}_2\text{Br}$		
IX. $p(\text{CH})\text{pA}$	0,013	8,0
$\text{NHCOCH}_2\text{Br}$		

12 раз. Таким образом, замещение по терминальному фосфату АТФ отрицательным образом сказывается на средстве соединения к активному центру каталитической субъединицы. Большое значение для взаимодействия с ферментом имеют модификации, связанные с заменой  $\alpha$ ,  $\beta$ - и  $\beta$ ,  $\gamma$ - мостиковых кислородных атомов АТФ на метиленовые звенья (соединения VIII и XI). Такое разное средство этих аналогов к АТФ-связывающему центру, по-видимому, объясняется различным строением их комплексов с  $\text{Mg}^{2+}$ .

В отличие от указанных выше веществ ингибирование каталитической субъединицы протеинкиназы, вызываемое соединениями V, IX, XII и XIX—XXII, развивалось во времени, причем достигалась практически полная инактивация фермента (см. табл. 16).

АТФ в концентрациях от 0,2 до 1 мМ защищал фермент от инактивации аналогами, что указывало на протекание реакции модификации по активному центру. Защитный эффект АТФ показан на рис. 72, где в качестве примера взяты соединения V и XX. При изучении рН-зависимости скорости модификации каталитической субъединицы под действием соединения V была получена сигмоидная кривая с перегибом в области 6,6—6,8 (рис. 73), что свидетельствовало в пользу ковалентного блокирования имидазольного кольца остатка гистидина в активном центре. Учитывая, что при связывании с ферментом соединения V его алкилирующая  $\text{ClCH}_2$ -группировка должна располагаться в непосредственной близости от функциональной группы, катализирующей расщепление  $\gamma$ -P-O-связи АТФ, можно предположить возможное участие остатка гистидина в каталитическом действии фермента. Ранее сходные результаты были получены при изучении АТФ-связывающего участка цАМФ-зависимой протеинкиназы из мозга свиньи [2, 8].

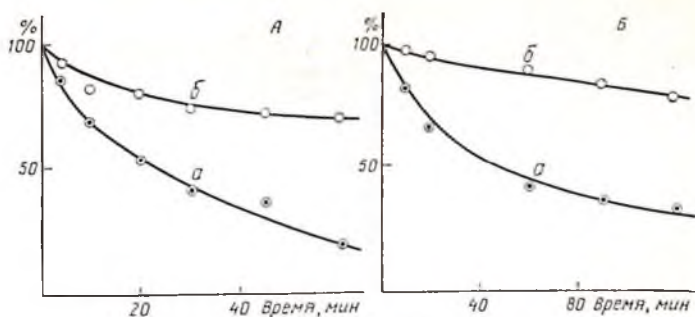


Рис. 72. Влияние  $(\text{ClCH}_2)_3\text{PA}$  (V) и  $p\text{-FO}_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{O}$  pA (XX) на активность каталитической субъединицы и защитный эффект АТФ.

По оси ординат — остаточная активность каталитической субъединицы, выраженная в процентах. А — каталитическую субъединицу инкубировали в 50 мМ калийфосфатном буфере (рН 6,5) в присутствии 0,2 мМ соединения XX и 2 мМ  $\text{MgCl}_2$  (а), либо в присутствии 0,2 мМ соединения XX, 4 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 2 мМ АТФ (б); Б — каталитическую субъединицу инкубировали в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,4) в присутствии 5 мМ соединения V и 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  (а), либо в присутствии 5 мМ соединения V, 20 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 1 мМ АТФ (б).

Анализ взаимодействия аналогов АТФ с аденилатциклазой и протеинкиназой позволяет сделать некоторые выводы относительно общности и различий в структуре активных центров этих ферментов. Для связывания как с аденилатциклазой, так и с протеинкиназой важное значение имеет трифосфатный участок АТФ. Однако если для аденилатциклазы замещение по  $\gamma$ -атому фосфора существенно не сказывается на сродстве к активному центру, то в случае протеинкиназы для взаимодействия с АТФ-связывающим участком необходимо наличие незамененного  $\gamma$ -фосфата. Кроме того, конформация трифосфатного фрагмента АТФ в активном центре протеинкиназы является, по-видимому, вытянутой, тогда как сближенность  $\alpha$ -фосфатного гидроксила и 3'-ОН-группы АТФ в активном центре аденилатциклазы предопределяет иную, более компактную, структуру этого участка АТФ. И, наконец, в активном центре аденилатциклазы в области связывания  $\gamma$ -атома фосфора отсутствует функциональная группа, необходимая для проявления активности фермента, тогда как в активном центре протеинкиназы в районе связывания  $\gamma$ -фосфата находится каталитическая группа, по-видимому, имидазольное кольцо остатка гистидина.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАМОДЕЙСТВИЯ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ С АНАЛОГАМИ цАМФ

В настоящее время имеется большое количество данных, касающихся действия различных соединений на фосфодиэстеразу циклического нуклеотида [4, 9—11]. Тем не менее результаты этих исследований недостаточны для установления структуры активного центра данного фермента. Поэтому в нашей работе

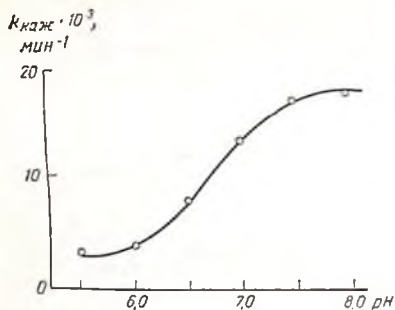


Рис. 73. Зависимость скорости модификации каталитической субъединицы под действием  $(\text{ClCH}_2)_3\text{ppA}$  (V) от pH.

По оси ординат — значения  $K_{\text{каж}}$ . Инкубацию каталитической субъединицы проводили в присутствии 5 мМ соединения V и 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  в 50 мМ калийфосфатном буфере.

было изучено взаимодействие частично очищенной фосфодиэстеразы из печени крысы с синтезированными нами аналогами цАМФ, содержащими в различных положениях молекулы реакционно-способные или заряженные группировки [12—14]. Часть из этих соединений была использована нами ранее для исследования цАМФ-связывающего участка протеинкиназы из мозга свиньи [8, 12, 13]. Структура испытанных аналогов цАМФ приведена в табл. 17 и 18.

ТАБЛИЦА 17

ИНГИБИРУЮЩИЕ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА АНАЛОГОВ ЦАМФ В ОТНОШЕНИИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

Соединение	$K_i$ , мМ	$K_i/K_i$ теоф	Степень гидролиза относительно цАМФ, %
I. 8-Br-cAMP	0,049	0,22	19
II. 8-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH-cAMP	0,235	1,07	0
III. 8-NHCH <sub>2</sub> COOH-cAMP	0,550	2,5	—
IV. 8-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -cAMP	0,780	3,54	0
V. 8-S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> -cAMP	0,075	0,34	0
VI. 8-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOSH <sub>3</sub> -cAMP	1,000	4,54	0
XI. 1-N-OCH <sub>3</sub> -cAMP	0,450	2,04	98
XIII. 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOSH <sub>3</sub> -cAMP	2,080	9,45	100
XVI. 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> F-cAMP	0,288	1,31	10
XVII. 8-Br, 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> F-cAMP	0,075	0,34	0
XVIII. 2'-O-COSH <sub>2</sub> Cl-cAMP	0,043	0,20	—
XIX. 2'-O-COSH-CH <sub>2</sub> -cAMP	0,180	0,82	—
XX. N <sup>6</sup> -COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> , 2'-O-COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -cAMP	0,038	0,17	—
XXI. cAMP-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br	0,910	4,15	—
XXII. cAMP-OSH <sub>2</sub> COOH	0,400	1,82	0
Теофиллин	0,220	1,00	—

При изучении ингибирующего действия аналогов цАМФ в отношении фосфодиэстеразы было обнаружено, что часть из них являются обратимыми и конкурентными по отношению к цАМФ ингибиторами фермента (см. табл. 17).

Соединение	$k^*$ как, $\text{мин}^{-1}$	Степень гидролиза относительно цАМФ, %	pH инкубационной среды
VII. 8-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOCH <sub>2</sub> Cl-cAMP	0,008	11	7,5
VIII. 8-S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOCH <sub>2</sub> Cl-cAMP	0,0065	—	7,5
IX. 8-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NACOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> F-cAMP	0,010	—	6,8
X. 8-S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> F-cAMP	0,011	—	6,8
XII. 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Br-cAMP	0,007	100	6,8
XIV. 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOCH <sub>2</sub> Cl-cAMP	0,0023	—	7,5
XV. 8-Br, 1-N-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHCOCH <sub>2</sub> Cl-cAMP	0,0093	0	7,5

\* Аналоги были испытаны в концентрации 0,1 мМ.

Для оценки «правильности», стереоспецифичности связывания аналогов цАМФ в активном центре фосфодиэстеразы мы исследовали также субстратные свойства некоторых из них в отношении фермента (см. табл. 17 и 18).

Как видно из табл. 17, все 8-замещенные производные цАМФ, имеющие син-конформацию, являлись достаточно сильными ингибиторами фосфодиэстеразы, но были практически неспособны гидролизываться ферментом. В то же время 1-N-замещенные аналоги цАМФ, обладающие преимущественно антиконформацией, проявляли несколько более слабое ингибирующее действие, однако были субстратами фосфодиэстеразы. Эти результаты указывали, с одной стороны, на важное значение пуринового основания для гидрофобного взаимодействия с ферментом, а с другой — на предпочтительность антиконформации цАМФ для «правильной» посадки в активном центре. В случае же протеникиназы из мозга свиньи цАМФ-связывающий участок, по-видимому, специфичен к син-конформации циклического нуклеотида [13]. 2'-О-ацильные производные цАМФ проявляли достаточно высокое сродство (большее, чем теофиллин) к активному центру фосфодиэстеразы (см. табл. 17). По-видимому, в активном центре фосфодиэстеразы в отличие от регуляторного центра протеникиназы [12] отсутствует функциональная группа, ответственная за связывание 2'-ОН-группы остатка рибозы.

В активном центре фосфодиэстеразы в противоположность цАМФ-связывающему участку протеникиназы [12, 13] отсутствует катионная группа, участвующая в связывании фосфатного гидроксила цАМФ, поскольку нейтральный бромтиловый (XXI) и заряженный карбоксиметловый (XXII) эфиры цАМФ достаточно хорошо связываются с ферментом (см. табл. 17). Однако в районе этого участка активного центра, вероятно, находится ката-

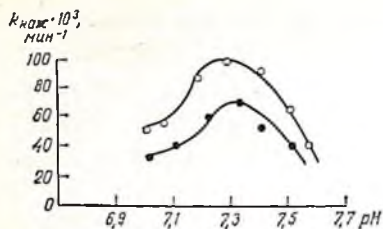


Рис. 74. pH-зависимость ингибирования фосфодиэстеразы.  
 $S-ClCH_2CONHCH_2CH_2NH-cAMP$  (VII) (белые кружки) и  $I-ClCH_2CONHCH_2NCH_2O-cAMP$  (XIV) (черные кружки). Инкубацию фермента проводили в присутствии 0,1 мМ аналога, 1 мМ  $MgCl_2$  и 0,75 мМ меркаптоэтанола в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 4,8—7,6) либо в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,3—8,0).

литическая группа, принимающая участие в расщеплении циклофосфатного кольца цАМФ, так как соединение XXII не подвергается гидролизу фосфодиэстеразой (см. табл. 17). Это связано со стерическим экранированием 3'-P-O-связи объемной карбоксильной группой, входящей в состав соединения XXII.

Среди исследованных аналогов цАМФ были обнаружены соединения, необратимо ингибирующие активность фосфодиэстеразы (см. табл. 18).

В концентрации 1 мкМ цАМФ защищал фермент от инактивации данными аналогами, что указывало на их взаимодействие с активным центром. В ряду ингибиторов, обладающих необратимым характером действия, оказались два соединения, имеющие одну и ту же активную группировку в различных положениях аденинового основания (VII и XIV). Мы исследовали pH-зависимость действия этих ингибиторов и обнаружили, что максимальное ингибирование в обоих случаях происходит при pH 7,3—7,4 (рис. 74), что свидетельствует о модификации одного и того же аминокислотного остатка.

На основании полученных результатов и анализа некоторых данных литературы можно предложить одну из возможных моделей активного центра фосфодиэстеразы (рис. 75). Посадка цАМФ в активном центре осуществляется за счет взаимодействия аденинового кольца и экзо- $NH_2$ -группы ( $N^6$ -ацильные производные цАМФ не гидролизуются фосфодиэстеразой [9]) с соответственно остатком ароматической аминокислоты и протоподонорной группой (X), находящимися в гидрофобной щели фермента. При этом «правильное» связывание определяется антиконформацией циклического нуклеотида. И, наконец, в области связывания циклофосфатного кольца находится каталитическая группа (Z) и еще одна нуклеофильная группа (Y), взаимодействующая с 5'-эфирным атомом кислорода (5'-дезоксиг-5'-метиленовые аналоги цАМФ не обладают заметным сродством к фосфодиэстеразе [11]).

Приведенные характеристики активных центров аденилатциклазы, протеникиназы и фосфодиэстеразы являются далеко не полными. Дальнейшие исследования в этом направлении, в том числе основанные на специфическом, ковалентном блокировании определенных участков активного центра данных ферментов, смогут

существенно дополнить наши представления о функциональной топографии активных центров указанных ферментов.

Изучено действие различных аналогов АТФ на солибилизованную аденилатциклазу из сердца кролика и каталитическую субъединицу протеникиназы из грудной мышцы голубя, а также аналогов цАМФ — на фосфодиэстеразу из печени крысы. Выявлены некоторые закономерности связывания данных аналогов с указанными ферментами. Сделаны предположения относительно строения АТФ-связывающего участка аденилатциклазы и протеникиназы, и цАМФ-связывающего участка активного центра фосфодиэстеразы.

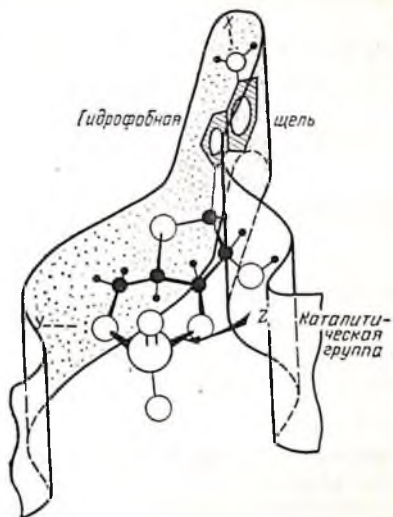


Рис. 75. Гипотетическая схема строения активного центра фосфодиэстеразы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев В. Ю., Гуляев Н. Н., Северин Е. С.— Журн. Всес. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1975, 20, 306—322.
2. Гуляев Н. Н., Тулицкая В. Л., Баранова Л. А. и др.— Биохимия, 1976, 41, 1241—1249.
3. Гуляев Н. Н., Шаркова Е. В., Дедюкина М. М. и др.— Биохимия, 1971, 36, 1267—1273.
4. Тулицкая В. Л., Хронов Ю. В., Баранова Л. А. и др.— В кн.: Тезисы докладов I Всесоюзной конференции по химии нуклеозидов и нуклеотидов. Рига, 1978, с. 66—67.
5. Hoppe J., Maritzky R., Freist W., Wagner K. G.—Eur. J. Biochem., 1977, 80, 369—372.
6. Bechel P. J., Beavo J. A., Krebs E. G.—J. Biol. Chem., 1977, 252, 2691—2697.
7. Буларгина Т. В., Гривенников Н. А., Северин Е. С.— В кн.: Тезисы докладов I Всесоюзной конференции по химии нуклеозидов и нуклеотидов. Рига, 1978, с. 83—84.
8. Severin E. S., Nesterova M. V., Gulyaev N. N., Shlyapnikov S. V.—Adv. Enzyme Regulation, 1976, 14, 407—444.
9. Simon L. N., Shuman D. A., Robins R. K.—Adv. Cycl. Nucl. Res., 1973, 3, 225—353.
10. Meyer R. B., Miller J. P.—Life Sciences, 1974, 14, 1019—1040.
11. Amer M. S., Kreighbaum W. E.—J. Pharm. Sci., 1975, 64, 2—36.
12. Severin E. S., Nesterova M. V., Sashchenko L. P., Rasumova V. V., Tunit-skaya V. L., Kochetkov S. N., Gulyaev N. N.—Biochim. biophys. Acta, 1975, 384, 413—422.
13. Гуляев Н. Н., Тулицкая В. Л., Нестерова М. В. и др.— Биохимия, 1977, 42, 2071—2078.
14. Гуляев Н. Н., Тулицкая В. Л., Мазурова Л. А., Северин Е. С.—Биоорганическая химия, 1979, 5. В печати.

## АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

М. ВОНН (M. VAUGHAN), Д. МОСС (J. MOSS) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

Сейчас принято считать, что влияние холерогена на клетки позвоночных связано с аккумуляцией внутриклеточного цАМФ (аденизин 3',5'-монофосфат), которая имеет место после активации аденилатциклазы токсином. Холероген представляет собой сложную молекулу (табл. 19), состоящую из пяти субъединиц

ТАБЛИЦА 19

ХОЛЕРОГЕН: СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ \*

$A_1$ -S-S- $A_2$ (B)<sub>5</sub>

Пептид	$M_r^{**}$	Функция
$A_1$	23 500	Активация аденилатциклазы
$A_2$	5 500	Неизвестна
B	11 600	Связывание с ганглиозидом $G_{M1}$ на поверхности клетки

\* Основана на данных [1—6].

\*\* Молекулярная масса.

(11 600), связанных нековалентно с одной субъединицей A. Эта субъединица состоит из двух пептидов  $A_1$  и  $A_2$  (23 500 и 5 500 соответственно), соединенных одной дисульфидной связью. В нескольких лабораториях [1—6] было показано, что холероген связывается с поверхностью клетки за счет взаимодействия субъединицы B с олигосахаридной частью ганглиозида  $G_{M1}$  плазматической мембраны. Однако в разрушенных клетках для активации аденилатциклазы не требуется ни  $G_{M1}$ , ни субъединицы B. В этом случае, как было впервые показано [7], оказывается необходимым присутствие НАД- и  $A_1$ -пептида [8], который становится активным только после высвобождения из субъединицы A в результате восстановления.

В 1976 г. в процессе изучения механизма взаимодействия холерогена с НАД при активации аденилатциклазы нами было установлено, что токсин обладает НАД-гликогидролазной и АДФ-рибозилтрансферазной активностью (табл. 20). Мы предположили, что холероген активирует аденилатциклазу за счет катализа АДФ-рибозилирования аргинина или аминокислотного остатка белка, являющегося самой циклазой, или регуляторного компонента циклазной системы [9—11]. В пользу точки зрения, что АДФ-

РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ ХОЛЕРОГЕНОМ, ЭНТЕРОТОКСИНОМ  
(ТЕРМОЛАБИЛЬНЫМ) И АДФ-РИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗой  
ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ИНДОКА

- I. НАД-гликогидролаза  
 $\text{НАД} + \text{ПОИ} \rightarrow \text{АДФ-рибоза} + \text{никотинамид} + \text{H}^+$
- II. АДФ-рибозилтрансфераза  
 $\text{НАД} + \text{аргинин}^* \rightarrow \text{АДФ-рибозиларгинин} + \text{никотинамид} + \text{H}^+$   
 $\text{НАД} + \text{белок} \rightarrow \text{АДФ-рибозилпротеин} + \text{никотинамид} + \text{H}^+$

\* Некоторые другие вещества, содержащие гуанидин, также могут выступать в качестве акцепторов АДФ-рибозы. Была показана возможность АДФ-рибозилирования очищенных белков, лизоцима, полиаргинина, гистонов всеми тремя ферментами [14, 15], а клеточных белков — холерогеном [20—22].

рибозилприваление может приводить к увеличению аденилатциклазной активности, свидетельствует тот факт, что термолабильный энтеротоксин *E. coli*, который активирует аденилатциклазу по НАД-зависимому механизму [12], также обладает АДФ-рибозилтрансферазной активностью [13], и выделение из эритроцитов индока АДФ-рибозилтрансферазы, которая активирует аденилатциклазу [14]. В данном сообщении приводятся некоторые характеристики этого фермента из птиц и двух ферментов из бактериальных токсинов, которые катализируют НАД-зависимую активацию аденилатциклазы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метилловый эфир L-аргинина-ди-НСl, лизоцим (18 000 МЕ/мг), полиаргинин, гистон (тип IIA, вилочковая железа теленка), фосфоэстераза из змеиного яда и НАД были получены от «Sigma»: [карбонил- $^{14}\text{C}$ ] НАД (50 мCi/ммоль и аденин [ $\text{V-}^{14}\text{C}$ ] НАД (280 мCi/ммоль) — от «Amersham/Searle». A1-X2 («Bio-Rad»), 100—200 меш (в форме хлорида) промывали 0,5 М NaOH, водой до нейтральной реакции, 0,5 М HCl и вновь водой до нейтральной реакции. Колодки (0,5×4 см) перед использованием для отделения [карбонил- $^{14}\text{C}$ ] никотинамида от негидролизованного [карбонил- $^{14}\text{C}$ ] НАД и были промыты 2 мл 20 мМ трис-HCl (pH 7,45).

Холероген был получен от «Schwarz/Mann». Выделяемый полимиксомом термолабильный энтеротоксин *E. coli* описан в работах [13 и 15]. АДФ-рибозилтрансфераза была очищена из фракции супернатанта (100 000 г 30 мин) промытых эритроцитов индока, суспендированных в 50 мМ буфере фосфата калия (pH 7,0). После кислотного осаждения, экстракции спиртом и хроматографии на фосфатцеллюлозе и фенилсефарозе фермент давал при электрофорезе в полиакриламидном геле одну широкую полосу [14].



## ИЗМЕРЕНИЯ НАД-ГЛИКОГИДРОЛАЗНОЙ И АДФ-РИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Эти методики подробно описаны в работах [9, 10]. Для обоих измерений в качестве субстрата использовался [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]НАД; при измерении АДФ-рибозилтрансферазной активности акцептора АДФ-рибозы обычно присутствовал аргинин или метиловый эфир аргинина. Буферы и концентрации субстратов варьировались в зависимости от источника фермента (холероген; токсин *E.coli* или эритроцитарная АДФ-рибозилтрансфераза) и типа эксперимента.

В стандартных опытах с холерогеном среда для определения НАД-гидролазной активности содержала 400 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0); 20 мМ дитиотрейтол и 2 мМ [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]НАД (около 40 000 имп/мин); для определения АДФ-рибозилтрансферазной активности в среду добавляли также 75 мМ метиловый эфир аргинина. Определение начинали, добавляя холероген в 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ NaN<sub>3</sub>. После инкубации при 30° С в течение определенного промежутка времени две пробы из каждой пробирки наносили на колонки (0,5×4 см) с «Dowex» 1 (приготовление колонок описано в разделе «материалы»). [Карбонил- $^{14}\text{C}$ ]-никотинамид элюировали пятью порциями по 1 мл 20 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5); количество радиоактивного соединения в собираемых пробах определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрометре. Эффективность данного метода для количественного выделения [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]-никотинамида и его отделения от [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]НАД проверяли тонкослойной хроматографией [9].

В эксперименте с термолabileм энтеротоксином *E.coli* условия были те же, что и для холерогена, за исключением того, что использовали 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,3) и инкубацию проводили при 30° С [13]. Стандартные условия для опытов с АДФ-рибозилтрансферазой, очищенной из эритроцитов индюка: 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), 30 мМ [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]НАД (около 40 000 имп/мин), 75 мМ метиловый эфир аргинина; 0,3 мг овальбумина в объеме 0,3 мл [14]. При определении НАД-гликогидролазной активности метиловый эфир аргинина не добавляли. Определение начинали, добавляя фермент и инкубируя при 30° С в течение 5 ч, после чего выделяли [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]-никотинамид по описанной выше методике.

### АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Инкубации с холерогеном, энтеротоксином *E.coli* или АДФ-рибозилтрансферазой индюка проводили так же, как описано для определения НАД-гликогидролазной активности каждого из этих ферментов, только вместо [карбонил- $^{14}\text{C}$ ]НАД добавляли [адезин- $^{14}\text{C}$ ]НАД, а потенциальный АДФ-рибозилакцепторный белок

присутствовал в концентрации 5 мг/мл. По окончании инкубации к образцам добавляли  $\frac{1}{3}$  объема холодной 20% трихлоруксусной кислоты, затем пробы выдерживали 30 мин при 0° С, после чего наносили на 0,45 мкм миллипоровые фильтры. Пробирки и фильтры промывали 3 раза 2 мл холодной 5% трихлоруксусной кислоты. Высушенные фильтры переносили в сцинтилляционные флаконы и растворяли в 2 мл «Piersolve» («Pierce»). Радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрометре после добавления раствора для счета [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Холероген

Наши первоначальные попытки показать ферментативную активность холерогена основывались на данных о том, что дифтерийный токсин вызывает НАД-зависимое ингибирование синтеза белка, катализируя АДФ-рибозилирование фактора элонгации II [16]. Для реакций, катализируемых холерогеном, аналогичные белковые акцепторы известны не были. Однако показано, что в отсутствие фактора элонгации II дифтерийный токсин проявляет НАД-гликогидролазную активность [17]. Нам удалось также обнаружить, что холероген сходным образом катализирует гидролиз НАД с образованием АДФ-рибозы и никотинамида (реакция 1, см. табл. 20). В дальнейшем была исследована способность многих обычно встречающихся в белках аминокислот служить акцепторами АДФ-рибозы при инкубации с НАД и холерогеном. Эффективным оказался только аргинин; никотинамид и соединение со свойствами АДФ-рибозиларгинина образовывались при этом в эквимолярном отношении [10].

Стереоспецифичность АДФ-рибозилтрансферазной реакции установил N. J. Oppenheimer [18]. В результате взаимодействия  $\beta$ -НАД с L-аргинином, катализируемого холерогеном, образуется  $\alpha$ -АДФ-рибозил-L-аргинин (рис. 76), из которого сравнительно быстро образуется смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм [18]. Кроме аргинина, АДФ-рибозными акцепторами могут быть и некоторые другие гуанидиновые соединения, в том числе и сам гуанидин [10]. Более эффективны, чем аргинин, метиловый эфир аргинина и агматин [10, 19]. У этих соединений карбоксильная часть молекулы блокирована либо отсутствует; соответственно поэтому они, возможно в большей степени, чем свободный аргинин, соответствуют естественному акцептору, роль которого, согласно нашим представлениям, играет остаток аргинина в белке, амино- и карбоксильная группы которого вовлечены в образование пептидных связей.

Как показано в табл. 21, для проявления ферментативной активности холерогена необходимо присутствие относительно высоких концентраций тиола, возможно для восстановления дисуль-

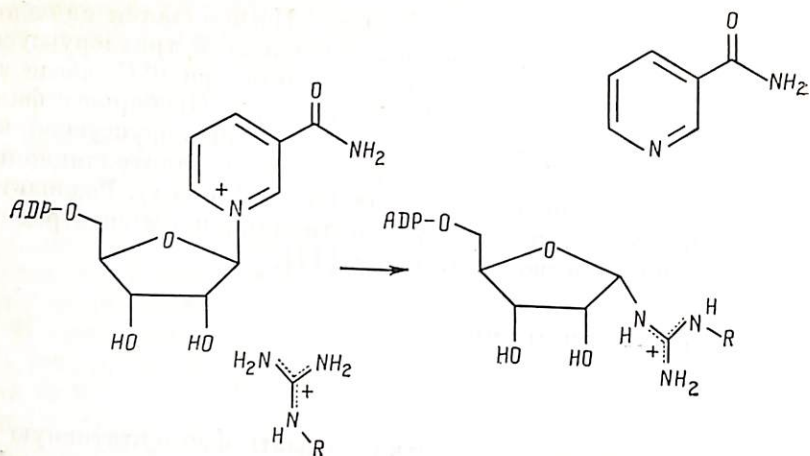


Рис. 76. Стереоспецифичность гуанидинзависимой АДФ-рибозилтрансферазной реакции.

Фидной связи в субъединице А и образования активного пептида А<sub>1</sub> [9]. В других экспериментах (J. Moss, S. J. Stanley, M. C. Lin; неопубликованные данные) было показано, что пептид А<sub>1</sub> ответствен за НАД-гликогидролазную и АДФ-рибозилтрансферазную активность холерогена, а также за активацию аденилатциклазы [8]. Дитиотрейтол не влияет на ферментативную активность восстановленного и алкированного пептида А<sub>1</sub> (J. Moss, S. J. Stanley, M. C. Lin; неопубликованные данные).

Некоторые очищенные белки могут служить акцепторами АДФ-рибозы в трансферазной реакции, катализируемой холерогеном [14]. Как показано в табл. 22, добавление 75 мМ метилового эфира аргинина приводило к уменьшению АДФ-рибозилирования белка в этом эксперименте приблизительно на 50% (ве-

ТАБЛИЦА 21

ВЛИЯНИЕ ТИОЛВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ АГЕНТОВ НА НАД-ГЛИКОГИДРОЛАЗНУЮ И АДФ-РИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРОГЕНА

Концентрация добавленного тиола, мМ*	Активность фермента, нмоль/мин на 1 мг холерогена	
	гидролазная	трансферазная
Дитиотрейтол	0,3	0,67
	3	2,9
Глутатион	30	17
	0,3	1,1
	3	0,67
	30	7,6
		0,44
		8,2
		52
		0,67
		3,6
		24

\* В отсутствие тиола активность практически не наблюдалась.

ТАБЛИЦА 22

АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ХОЛЕРОГЕНОМ И ИНГИБИРУЕМОЕ МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ АРГИНИНА

Белок, 5 мг/мл	Включение АДФ-рибозы, имоль/мин на 1 мг	
	без метилового эфира аргинина	75 мМ метилового эфира аргинина
Гистон	2,7	1,4
Лизоцим	1,3	0,6
Полиаргинин	6,5	3,2

личина  $K_m$  для метилового эфира аргинина в качестве акцептора АДФ-рибозы с холерогеном составляет примерно 50 мМ).

При инкубации лизоцима, АДФ-рибозилированного в присутствии холерогена и [аденин- $^{14}C$ ]НАД с фосфодиэстеразой зменного яда происходило практически полное высвобождение радиоактивности, при этом ее подвижность в пластинках при тонкослойной хроматографии не отличалась от подвижности 5'-АМФ. Такой результат ожидался для АДФ-рибозилированного, но не поли(АДФ-рибозилированного) белка. Аминокислоты, АДФ-рибозилированные в лизоциме и гистоне, не были обнаружены. Однако нужно отметить, что метиловый эфир аргинина (см. табл. 22) или аргинин могут ингибировать этот процесс, в то время как другие аминокислоты, не являющиеся акцепторами АДФ-рибозы и, вероятно, не взаимодействующие с каталитическим центром холерогена, не обладают этим свойством. Все эти факты подтверждают точку зрения, что аргинин является акцептором аминокислот в белках, АДФ-рибозилированных холерогеном.

Несмотря на видимую очевидность гипотезы о том, что активация аденилатциклазы холерогеном происходит в результате АДФ-рибозилирования компонента циклазной системы, оказалось весьма сложным идентифицировать этот специфический белок. Для этого необходимо было показать, меняется ли функция АДФ-рибозилированного белка, поскольку холероген катализирует АДФ-рибозилирование очень большого количества белков, присутствующих в модельной системе.

Подтверждена [20] точка зрения, что АДФ-рибозилированию подвергается ГТФ-связывающий белок, ассоциированный с аденилатциклазой. Продемонстрировано [21] АДФ-рибозилирование белка, который, возможно, представляет собой ГТФ-связывающий белок. Ранее было высказано предположение [23], что холероген ингибирует специфическую ГТФ-азу, которая гидролизует связанный ГТФ и таким образом лимитирует активность аденилатциклазы. Такой же представляется роль АДФ-рибозилированного белка в активации аденилатциклазы холерогеном. Полученные результаты [22] также согласуются с ролью АДФ-рибозилированного белка в активации аденилатциклазы холерогеном.

## Термолабильный энтеротоксин E.coli

Термолабильный энтеротоксин E.coli, как и холероген, вызывает НАД-зависимую активацию аденилатциклазы [17]. Он также обладает НАД-глюкогидролазной активностью и катализирует АДФ-рибозилирование аргинина, некоторых других гуанидинсодержащих соединений и нескольких белков [10, 18, 24]. Эти реакции показаны в табл. 20. Стереоспецифичность реакции, в которой акцептором является аргинин, и природа АДФ-рибозилированного продукта реакции с лизоцимом весьма сходна с соответствующими параметрами аналогичных реакций, катализируемых холерогеном (табл. 23). Несмотря на то что оба токсина проявляют максимальную активность лишь в присутствии дитиотрейтола (или другого тиола) и обладают одинаковым средством к

ТАБЛИЦА 23

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ХОЛЕРОГЕНОМ, ТЕРМОЛАБИЛЬНЫМ ЭНТЕРОТОКСИНОМ E. COLI И АДФ-РИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗой ИХ ЭРИТРОЦИТОВ ПИДЮКА

- 3.1. Субстратом является  $\beta$ -НАД.
2. Продуктом реакции с аргинином служит  $\alpha$ -АДФ-рибозиларгинин.
3. Когда акцептором является лизоцим, продукт представляет собой АДФ-рибозиллизоцим без признаков образования поли(АДФ-рибозил)-белка.

ТАБЛИЦА 24

СРАВНЕНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ ХОЛЕРОГЕНА, ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА E. COLI И АДФ-РИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ПИДЮКА

Свойство	Холероген	Термолабильный токсин	АДФ-рибозилтрансфераза
Молекулярная масса	87 000	20 000	25 000
Субъединицы	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> B		
Необходимость ДТТ	Есть	Есть	Нет
K <sub>m</sub> для НАД	4 мМ	8 мМ	30 мкМ
K <sub>m</sub> для метилового эфира аргинина, мМ	50	240	2 и 50
Эффективность гуанидиновых соединений (75 мМ) в качестве субстратов	Метилловый эфир аргинина > L-аргинина ~ D-аргинину	Метилловый эфир аргинина > L-аргинина ~ D-аргинину ~ гуанидину	Метилловый эфир аргинина > L-аргинина ~ D-аргинину
Эффективность белков (5 мг/мл) в качестве акцепторов АДФ-рибозы	Полиаргинин > гистона > лизоцима	Полиаргинин >> гистона ~ лизоциму	> гуанидина > Гистон > лизоцима ~ полиаргинину

НАД, имеются существенные различия в их ферментативных свойствах (табл. 24). Токсин из *E.coli* обладает значительно меньшим сродством к метиловому эфиру аргинина, чем холероген, а относительная эффективность различных гуанидинсодержащих соединений или белков в качестве акцепторов АДФ-рибозы также несколько различается для двух токсинов (см. табл. 24). Тот факт, что два структурно различных белка (у которых есть некоторые сходные черты в структуре [25] и иммунологической активности [26—28]) катализируют НАД-зависимую активацию аденилатциклазы и обладают НАД-гликогидролазной и АДФ-рибозилтрансферазной активностью, свидетельствует в пользу точки зрения, что активация обусловлена АДФ-рибозилированием белкового компонента аденилатциклазной системы.

### АДФ-рибозилтрансфераза из эритроцитов индюка

Для исследования вопроса о том, могут ли клетки животных использовать для активации аденилатциклазы механизм АДФ-рибозилирования, мы выбрали фермент, который, подобно холерогену и термолабильному энтеротоксину *E.coli*, обладал бы способностью катализировать синтез АДФ-рибозиларгинина. Обладающая такими свойствами АДФ-рибозилтрансфераза была очищена из фракции супернатанта эритроцитов индюка, как описано в экспериментальной части [14]. Стереоспецифичность реакции с аргинином совпадает со стереоспецифичностью двух катализируемых токсинных реакций, приведенных на рис. 76 (J. Moss и др.; неопубликованные данные). Фермент также проявляет НАД-гликогидролазную активность и катализирует АДФ-рибозилирование полиаргинина, лизоцима и гистона (см. табл. 20). Продукт реакции с лизоцимом представляет собой АДФ-рибозил-, а не поли(АДФ-рибозил)-белок [14]. Как указано в табл. 25,

ТАБЛИЦА 25

АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ОЧИЩЕННОЙ ТРАНСФЕРАЗОЙ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ИНДЮКА И ИНГИБИРУЕМОЕ МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ АРГИНИНА

Белок, 5 мг/мл	Включение АДФ-рибозы, нмоль/мин на 1 мг	
	без метилового эфира аргинина	75 мМ метилового эфира аргинина
Гистон	130	2,6
Лизоцим	55	0,85
Полиаргинин	55	5,5

гистон был лучшим акцептором АДФ-рибозы, чем лизоцим или полиаргинин [14]. В случае же двух бактериальных токсинов, наоборот, полиаргинин был более эффективным, чем гистон.

АДФ-рибозилтрансфераза также отличается по некоторым параметрам от холерогена и термолабильного энтеротоксина *E.coli* (см. табл. 25). Молекулярная масса фермента из эритроцитов индюка составляет 25 000, т. е. немного больше, чем молекулярная масса каталитически активных единиц токсина, а его активность не увеличивается при внесении дигиотрейтола. Он обладает значительно большим сродством к НАД, чем токсин, а кинетика его взаимодействия с метиловым эфиром аргинина также весьма необычна (см. табл. 25). Несмотря на эти различия в свойствах, АДФ-рибозилтрансфераза из эритроцитов индюка оказывается функционально эквивалентной холерогену и термолабильному энтеротоксину *E.coli*. Она катализирует те же модельные реакции и активирует аденилатциклазу по НАД-зависимому механизму [14]. Играет ли она какую-либо роль в активации аденилатциклазы в intactном эритроците, остается неясным.

## ВЫВОДЫ

Три различных белка из разных источников — холероген, термолабильный энтеротоксин *E.coli* и АДФ-рибозилтрансфераза из эритроцитов индюка, могут осуществлять НАД-зависимую активацию аденилатциклазы. Эти белки различаются по структуре и ферментным характеристикам, но каждый из них катализирует гидролиз НАД и НАД-зависимое АДФ-рибозилирование аргинина, некоторых других гуанидинсодержащих соединений и белков. Все наши наблюдения подтверждают гипотезу о том, что два бактериальных токсина и фермент из птиц активируют аденилатциклазу за счет катализа АДФ-рибозилирования аргинина или похожего амфиокислотного остатка, входящего в состав белкового компонента циклазной системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finkelstein R. A. Cholera.—CRC Crit. Rev. Microbiol., 1973, 2, 553—623.
2. Van Heyningen W. E. Gangliosides as membrane receptors for tetanus, toxin, cholera toxin and serotonin.—Nature, 1974, 249, 415—417.
3. Bennett V., Guatrecasas P. Mechanism of action of *Vibrio cholerae* enterotoxin.—J. Membr. Biol., 1975, 22, 1—28.
4. Gill D. M. Mechanism of action of cholera toxin.—Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1977, 8, 85—118.
5. Van Heyningen S. Cholera toxin.—Biol. Rev., 1977, 52, 509—549.
6. Moss J., Vaughan M. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin.—Ann. Rev. Biochem. In press.
7. Gill D. M. Involvement of nicotinamide adenine dinucleotide in the action of cholera toxin in vitro.—Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2064—2068.
8. Gill D. M., King C. A. The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates.—J. biol. Chem., 1975, 250, 6424—6432.
9. Moss J., Manganiello V. C., Vaughan M. Hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide by cholera toxin and its A protomer: Possible role in the activation of adenylate cyclase.—Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 4424—4427.

10. Moss J., Vaughan M. Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 242, 2455—2457.
11. Moss J., Osborne J. C., Jr., Fishman P. H. et al. Effect of gangliosides and substrate analogues on the hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide by cholera toxin.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 74—78.
12. Gill D. M., Evans D. J., Jr., Evans D. G. Mechanism of activation of adenylate cyclase in vitro by polymyxin-released, head-labile enterotoxin of *Escherichia coli*.—*J. infect. Dis.*, 1976, 133 (Suppl.), S. 103—S. 107.
13. Moss J., Richardson S. H. Activation of adenylate cyclase by heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin.—Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of cholera toxin.—*J. clin. Invest.*, 1978, 62, 281—285.
14. Moss J., Vaughan M. Isolation of an avian erythrocyte protein possessing ADP-ribosyltransferase activity and capable of activating adenylate cyclase.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3621—3624.
15. Moss J., Garrison S., Oppenheimer N. J., Richardson S. H. NAD-dependent ADP-ribosylation of arginine and proteins by *E. coli* heat-labile enterotoxin.—*J. Biol. Chem.* In press.
16. Honjo T., Nishizuka Y., Kato I., Hayaishi O. Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by *Adiphtheria* toxin.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4251—4260.
17. Kandel J., Collier R. J., Chung D. W. Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide.—*J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 2088—2097.
18. Oppenheimer N. J. Structural determination and stereospecificity of the cholera toxin-catalyzed reaction of NAD<sup>+</sup> with guanidines.—*J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 4907—4910.
19. Moss J., Vaughan M. Role for ADP-ribosylation in the activation of adenylate cyclase by bacterial toxins and avian enzymes.—In: Proceedings of the Josiah Macy, Jr. Foundation Conference on Receptors and Human Diseases, New Orleans, La., December 4—6, 1978.
20. Cassel D., Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: Covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2669—2673.
21. Gill D. M., Meren R. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3050—3054.
22. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R. Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylate cyclase.—*J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 7120—7123.
23. Cassel D., Selinger Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 3307—3311.
24. Gill D. M., Evans D. J., Jr., Evans D. G. Mechanism of activation of adenylate cyclase in vitro by polymyxin-released heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*.—*J. infect. Dis.*, 1976, 133 (Suppl.), S. 103—S. 107.
25. Moss J., Garrison S., Oppenheimer N. J., Richardson S. H. ADP-ribosylation catalyzed by *E. coli* heat-labile enterotoxin: Possible role in the US-Japan Joint Cholera Conference, Karatsu, Japan, September 27—29, 1978, in press.
26. Robertson D. C., Kunkel S. L., Gilligan P. H. Purification and characterization of heat-labile enterotoxin produced by ENT<sup>+</sup> *E. coli*: Application of hydrophobic chromatography and use of defined media. The 14th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel, Karatsu, September 27—29, 1978, 75 (abs), 1978.
27. Gyles C. L., Barnum D. A. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs.—*J. infect. Dis.*, 1969, 120, 419—426.
28. Smith N. W., Sack R. B. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*.—*J. infect. Dis.*, 1973, 127, 164—170.



29. Holmgren J., Söderlind O., Wadström T. Cross-reactivity between heat labile enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in neutralization tests in rabbit ileum and skin.—Acta path. Microbiol. scand. [B], 1973, 81, 757—782.

УДК 612.173.1.015.12:577.152.361]:612.172.014.46:615.357.452

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ $\beta$ -АДРЕНЕРГИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗОЙ СЕРДЦА

В. А. ТКАЧУК, С. Е. СЕВЕРИН (СССР)

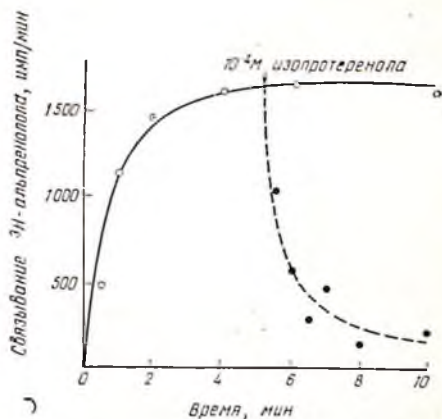
Действие катехоламинов на миокард проявляется через  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергические рецепторы. Механизмы функционирования и физиологические эффекты у этих двух типов рецепторов существенно различаются. Существует достаточно строгая избирательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторов и в отношении антагонистов. Фентоламин и феноксисбензамин блокируют действие  $\alpha$ -адренергических рецепторов, а дихлоризопротеренол, пропранолол, альпренолол, практолол и бутоксамин блокируют действие  $\beta$ -адренергических рецепторов.

После тщательного изучения действия катехоламинов и их антагонистов на аденилатциклазу миокарда Sutherland и соавт. в 1962 г. пришли к выводу, что синтез цАМФ в сердце находится под контролем  $\beta$ -адренергических рецепторов. Для объяснения взаимодействия  $\beta$ -рецепторов с аденилатциклазой была предложена модель [1], согласно которой аденилатциклазная система состоит из регуляторного и каталитического элементов, тесно связанных между собой и окруженных липидным матриксом. Регуляторный элемент — рецептор гормонов, расположенный на внешней стороне мембраны, а каталитический — собственно аденилатциклаза — находится на внутренней стороне мембраны.

До классических работ Sutherland рецептором гормонов называли некий компонент клетки, который «узнает» и связывает гормон, а затем участвует в его действии на клетку. В настоящее время функции рецептора ограничивают лишь узнаванием и связыванием молекул гормона. Таким образом, единственным прямым методом изучения свойств этого белка является измерение связывания гормона с рецептором. Для измерения связывания гормонов метод измерения связывания с рецептором был налажен более 10 лет назад. Корректное измерение связывания катехоламинов с их рецепторами стало возможным только после 1974 г., когда начали использовать меченые антагонисты катехоламинов [2—4].

В соответствии с классической фармакологической теорией агонисты и антагонисты конкурируют за одни и те же участки связывания, поэтому по вытеснению меченого антагониста можно

Рис. 77. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола с плазматическими мембранами сердца кролика. Через 5 мин после начала инкубации мембран с  $^3\text{H}$ -альпренололом среда была разделена на две порции и в одну из них был добавлен изопротеренол (добавка раствора изопротеренола изменила объем среды на 7%).



судить о связывании гормона с рецептором. Как видно из рис. 77, связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола, антагониста  $\beta$ -адренергических рецепторов, с мембранным препаратом сердца кролика происходит быстро и обратимо. После добавления в инкубационную среду изопротеренола, агониста  $\beta$ -адренергических рецепторов, происходит быстрое отщепление  $^3\text{H}$ -альпренолола от мембран. Нерадиоактивные антагонисты также вытесняют  $^3\text{H}$ -альпренолол из связи с рецептором, причем этот процесс зависит от стереической конфигурации молекул антагониста. На рис. 78 видно, что (+)-альпренолол (2) снижает связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола при концентрациях, в 100 раз больших, чем (-)-стереоизомер (1) альпренолола. Блокатор  $\alpha$ -адренергических рецепторов фентоламин (3) оказывает свое действие при концентрациях, на несколько порядков превышающих те, которые необходимы для проявления его физиологического действия.

Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола с мембранами сердца имеет кинетику с насыщением, а выражение этой зависимости в двойных обратных величинах или в координатах Скэтчарда дает одну прямую линию. Константа диссоциации для комплекса  $^3\text{H}$ -альпренолол — рецептор, полученная в экспериментах

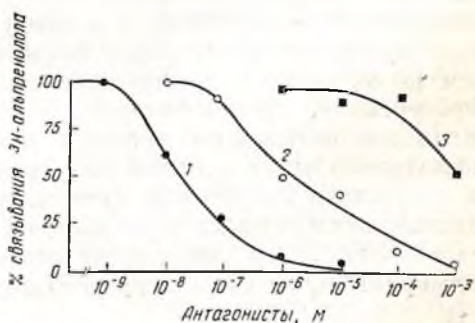


Рис. 78. Влияние нерадиоактивных соединений на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола с плазматическими мембранами сердца кролика. Объяснение в тексте.

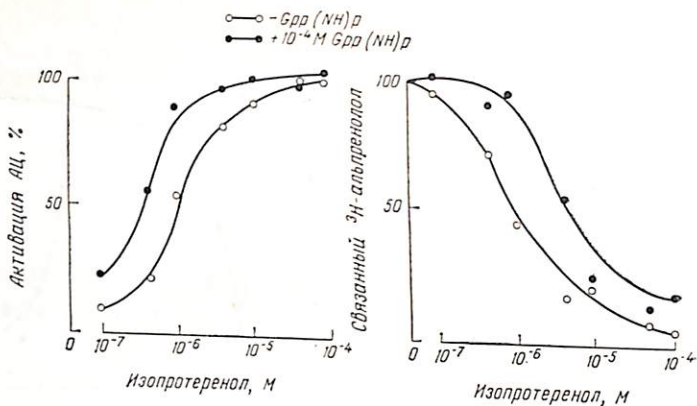
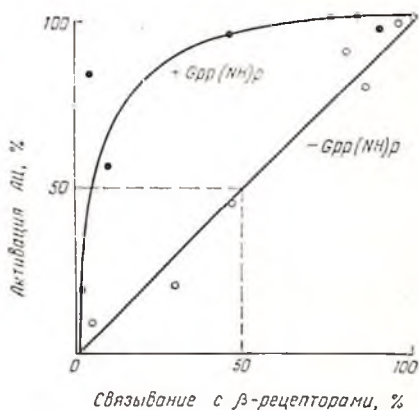


Рис. 79. Зависимость степени активации аденилатциклазы (левый рисунок) и связывания <sup>3</sup>H-альпrenoлола (правый рисунок) от концентрации изопротеренола. За 100 % активации аденилатциклазы принят эффект 10<sup>-4</sup> M изопротеренола. За 100 % связывания <sup>3</sup>H-альпrenoлола принято количество антагониста, которое специфически связывается в отсутствие изопротеренола.

на мембранах сердца кролика, равна 5,7 нм. Эта величина близка константам диссоциации, полученным на других объектах [4]. Кинетика связывания, его обратимость и стереоспецифичность позволили нам сделать вывод, что измеряемое связывание отражает процесс взаимодействия лиганда с β-адренергическим рецептором сердца.

В литературе по фармакологии и эндокринологии высказывается точка зрения, что связывание гормона с рецептором приводит к пропорциональному увеличению биологического ответа, и этот ответ становится максимальным, если все молекулы рецептора оккупированы молекулами гормонов. Появление прямых методов тестирования гормональных рецепторов дает возможность проверить это положение. На рис. 79 приведены результаты измерения зависимости активности аденилатциклазы сердца от концентрации изопротеренола в отсутствие и в присутствии гуанидилиминодифосфата — Gpp(NH)p, неметаболизирующего аналога ГТФ, а также зависимость связывания гормона от его концентрации, также измеренная в отсутствие и в присутствии Gpp(NH)p. Видно, что этот нуклеотид увеличивает средство к изопротеренолу, измеренное по активации аденилатциклазы, и уменьшает средство к изопротеренолу, установленное по вытеснению <sup>3</sup>H-альпrenoлола. Если эти результаты выразить как зависимость активации аденилатциклазы от степени оккупации рецепторов, окажется, что в отсутствие нуклеотида существует пропорциональность между связыванием гормона и активацией аденилатциклазы, а в присутствии Gpp(NH)p оккупация лишь 5—10% от всех рецепторов мембраны приводит к полумаксимальной активации аденилатцик-

Рис. 80. Зависимость между специфическим связыванием изопроterenолола (рассчитанным по вытеснению <sup>3</sup>H-альprenолола) и активацией аденилатциклазы сердца кролика.



лазы (рис. 80). При изучении пептидных гормонов также наблюдали, что максимальная активация аденилатциклазы может происходить при оккупации лишь 1—5% гормональных рецепторов [5].

Связывание с рецептором является условием обязательным, но недостаточным для проявления физиологического действия. Это хорошо иллюстрируют антагонисты, связывание которых с рецептором не вызывает никаких других эффектов, кроме вытеснения молекул гормона. Есть вещества, не влияющие на связывание катехоламинов с рецепторами, но препятствующие их действию на аденилатциклазу (антибиотик филипсин, SH-реагенты) [5]. Следовательно, биологический эффект не обязательно находится в прямой зависимости от количества гормонрецепторного комплекса или скорости его образования. По-видимому, в мембране есть «избыток» рецепторов или «резервные» рецепторы, а зависимость конечного эффекта от оккупации рецепторов подвержена многим влияниям.

Как уже отмечалось (см. рис. 79, 80), гуаниловые нуклеотиды влияют на константу связывания агонистов с рецепторами. Связывание же антагониста (альprenолол) с  $\beta$ -рецепторами сердца кролика было нечувствительно к ГТФ и Gpp(NH)p. Подобные результаты были получены и при изучении  $\beta$ -адренергических рецепторов в эритроцитах [6]. Это наблюдение заставляет нас более осторожно применять еще один постулат фармакологии и эндокринологии — утверждение, что агонист и антагонист связываются с одним и тем же участком на молекуле рецептора. Более правильным будет утверждение, что агонист и антагонист конкурируют за участок связывания на рецепторе. Фактически в настоящее время нет оснований исключить предположение, что агонист и антагонист связываются с разными участками, между которыми существует отрицательная кооперативность. По-видимому, Gpp(NH)p не взаимодействует непосредственно с  $\beta$ -адренергическими рецепторами. Об этом свидетельствуют следующие данные.

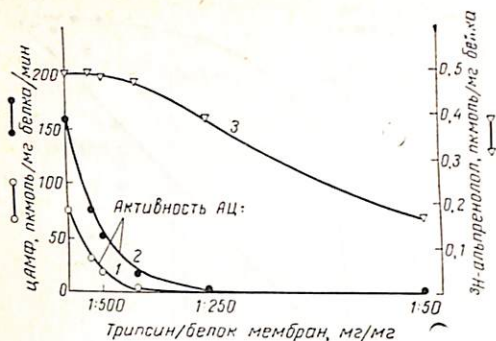


Рис. 81. Зависимость активности аденилатциклазы и специфического связывания  $^3\text{H}$ -альпренолола с мембранами сердца кролика от концентрации трипсина. Мембраны инкубировали с трипсином 10 мин при комнатной температуре, добавляли белковый ингибитор трипсина и затем измеряли активность аденилатциклазы или связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола.  
 1 — базальная активность; 2 —  $10^{-4}$  М изопротеренол; 3 — специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола.

Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола с мембранами сердца подавляется трипсином. При этом интересно отметить, что чувствительность к трипсину  $\beta$ -рецепторов, расположенных на наружной поверхности мембранных везикул, оказывается значительно меньшей, чем у аденилатциклазы, которая, по-видимому, расположена на внутренней стороне мембраны (рис. 81). Это свойство белков может быть использовано для «разобщения»  $\beta$ -рецепторов и аденилатциклазы, т. е. получения мембран, лишенных ферментативной активности, но сохранивших способность рецептировать гормоны. После преинкубации мембран сердца с трипсином, когда наступала полная инактивация аденилатциклазы, а количество  $\beta$ -рецепторов снижалось на 26%, мы не обнаружили влияния  $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$  на связывание ни альпренолола, ни изопротеренола. Таким образом, в действии гуаниловых нуклеотидов на связывание гормона с рецептором участвует либо аденилатциклаза либо другие белки, более чувствительные к трипсинолизу, чем рецепторный белок.

Интерес к изучению действия гуаниловых нуклеотидов на аденилатциклазу возник после серии блестящих работ лаборатории Rodbell [7—8], проведенных на мембранных препаратах пептидных гормонов (наиболее эффективно ГТФ) усиливают активацию АЦ гормоном. Данные Rodbell были подтверждены другими авторами, в частности на мембранных препаратах аденилатциклазы сердца [9]. В настоящее время подавляющее большинство исследователей считают, что гуаниловые нуклеотиды участвуют в передаче сигнала от рецептора к аденилатциклазе. По мнению Rodbell [10], активация аденилатциклазы сопряжена с гидролизом ГТФ. Для перевода аденилатциклазы в состояние с высокой каталитической активностью необходимо одновременное присутствие в среде и гормона и гуаниловых нуклеотидов. В подтверждение этой теории из мембран эритроцитов выделен ГТФ-связывающий белок. Показано, что он является гормонотактивируемой ГТФ-азой [11, 12]. В отсутствие этого белка аденилатциклаза

теряет чувствительность и к гормонам и к гуаниловым нуклеотидам.

Подобный белок нам удалось выделить из мембран сердца кролика. Удаление этого белка из мембран снижает активацию аденилатциклазы изопротеренолом и гуаниловыми нуклеотидами. Реконструкция фермента с этим белком повышает ответ аденилатциклазы на активирующее действие изопротеренола и гуаниловых нуклеотидов (табл. 26).

ТАБЛИЦА 26

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА, ЭКСТРАГИРОВАННОГО ИЗ МЕМБРАН СЕРДЦА КРОЛИКА, НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЭТИХ МЕМБРАНАХ

Добавки	Без фактора		После добавления фактора	
	удельная активность*	%	удельная активность*	%
Базальная активность	57,2±7,0	100	67,0±4,8	100
10 <sup>-4</sup> М изопротеренол	65,0±5,0	114	96,0±4,2	143
10 <sup>-4</sup> М Gpp(NH)p	66,0±9,5	115	104±3	155
10 <sup>-4</sup> М изопротеренол + 10 <sup>-4</sup> М Gpp(NH)p	115±8	201	170±5	254

\* пкмоль ЦАМФ на 1 мг белка в минуту.

Приведенные выше данные были получены на мембранных препаратах из сердца беспородных серых кроликов. Активация аденилатциклазы катехоламинами в этих мембранах происходила в отсутствие гуаниловых нуклеотидов и достигала 200—300%. При изучении мембранного препарата сердца кроликов линии New Zealand white мы обнаружили, что в отсутствие гуаниловых нуклеотидов аденилатциклаза практически нечувствительна к действию катехоламинов. Добавление в инкубационную среду ГТФ приводило к активации аденилатциклазы, однако и в присутствии ГТФ изопротеренол активировал аденилатциклазу лишь на 20—30% (рис. 82). Активация аденилатциклазы гуаниловыми нуклеотидами достоверно подавлялась альпренололом. Эти результаты давали основание предполагать, что у данной линии кроликов аденилатциклазная система сердца десенситизирована по отношению к катехоламинам.

Обычно десенситизация ткани развивается вследствие повышенного содержания гормона в крови. Можно было думать, что резерпин, блокирующий выброс катехоламинов в кровь, вернет аденилатциклазную систему сердца в состояние, чувствительное к действию катехоламинов. Действительно, после инъекции кроликам резерпина (за 24 и 2 ч перед декапитацией) мы смогли выделить мембранный препарат, в котором аденилатциклаза была

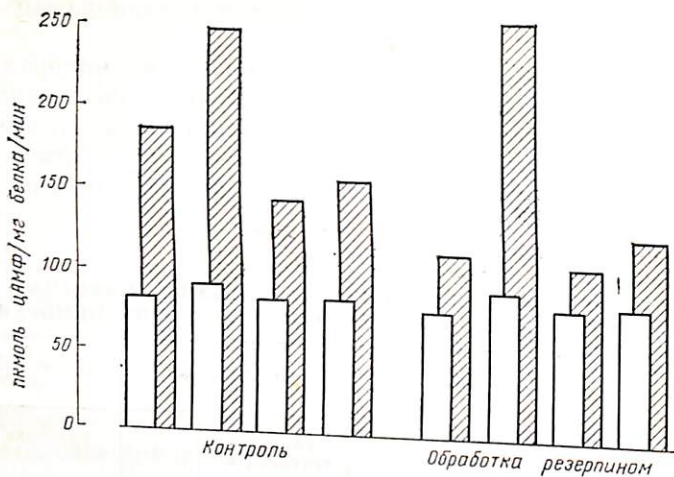


Рис. 82. Активность аденилатциклазы в мембранах сердца контрольных и обработанных резерпином кроликов. Заштрихованные столбики —  $+10^{-4}$  М ГТФ, светлые столбики — ГТФ.

высокочувствительна к действию изопротеренола. Как видно из рис. 82, аденилатциклаза сердца кроликов, обработанных резерпином, малочувствительна к активизирующему действию ГТФ, а изопротеренол + ГТФ вызывают более чем двукратную активацию аденилатциклазы. При этом не происходит изменения средства аденилатциклазы ни к изопротеренолу (рис. 83), ни к гуаниловым нуклеотидам (рис. 84). Отметим, что при совместном действии изопротеренола и гуаниловых нуклеотидов в мембранах контрольных и обработанных резерпином кроликов достигается практически одинаковая активность аденилатциклазы (см. рис. 82—84).

Под действием резерпина в мембранах сердца увеличивается количество  $\beta$ -адренергических рецепторов, которые мы выявляли по связыванию  $^3\text{H}$ -альпренолола (рис. 85). Если бы рецепторы контрольных мембран содержали связанные молекулы гормона, а рецепторы мембран, обработанных резерпином, были в свободном состоянии, то при титровании мембран  $^3\text{H}$ -альпренололом мы обнаружили бы уменьшение кажущегося средства этого антагониста к рецептору, а максимальный уровень связывания был бы одинаков (вследствие вытеснения молекул гормона альпренололом). Однако под действием резерпина изменялось лишь максимальное количество рецепторов, а средство к антагонисту оставалось неизменным. Об этом свидетельствует параллельный ход кривых на графике Скэтчарда для связывания альпренолола с контрольными и обработанными резерпином мембранами (см. рис. 85). Следовательно, резерпин не вызывал удаления молекул гормона с рецептора, а «выявлял» дополнительные молекулы  $\beta$ -адренергических рецепторов.

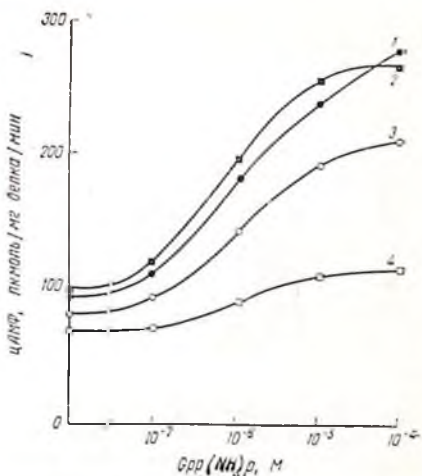
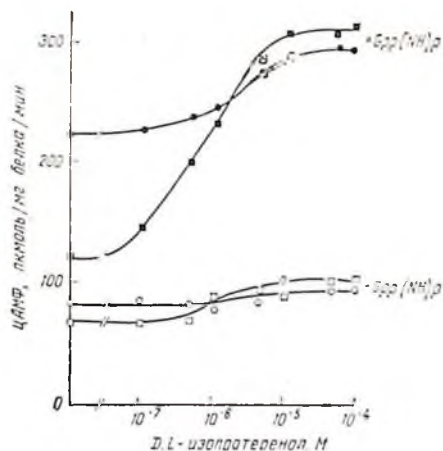


Рис. 83. Зависимость активности аденилатциклазы в мембранах сердца контрольных и обработанных резерпином кроликов от концентрации изопроterenола.

Рис. 84. Зависимость активности аденилатциклазы в мембранах сердца контрольных и обработанных резерпином кроликов от концентрации Gpp(NH)pp.

1, 3 — контроль; 2, 4 — обработка резерпином. 1, 2 —  $10^{-4}$  M изопроterenол; 3, 4 — без изопроterenола.

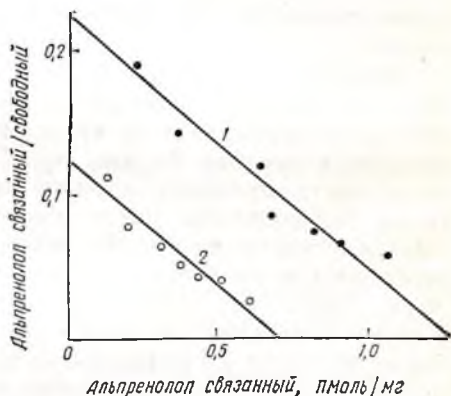
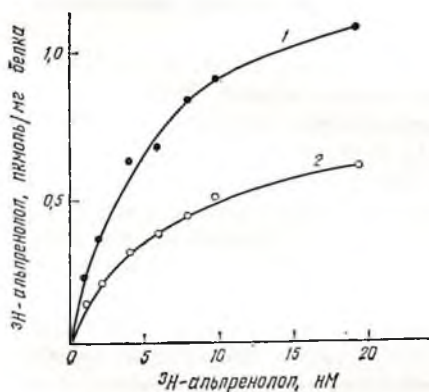


Рис. 85. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -альпиренолола с мембранами сердца контрольных и обработанных резерпином кроликов.

1 — обработка резерпином; 2 — контроль.

Основываясь на приведенных выше эффектах — повышении активирующего действия изопроterenола на аденилатциклазу и увеличении количества  $\beta$ -рецепторов под воздействием резерпина, мы вправе заключить, что понижение уровня катехоламинов в



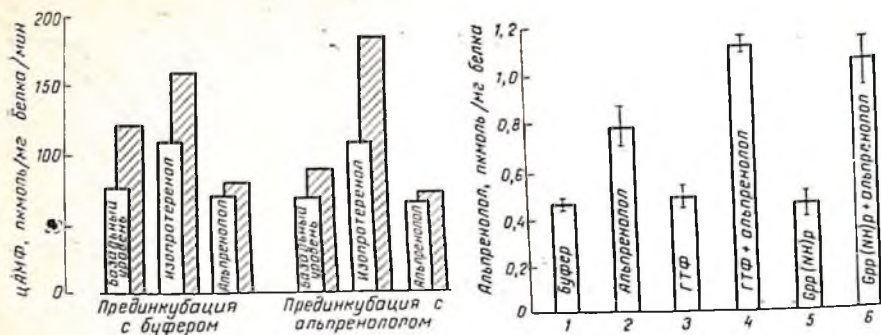


Рис. 86. Активность аденилатциклазы сердца кролика после преинкубации мембран в буферном растворе в отсутствие или в присутствии  $10^{-5}$  М альпренолола. Мембраны были преинкубированы 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , а затем 4 раза отмыты буферным раствором.

Светлые столбики — ГТФ, заштрихованные столбики —  $+10^{-4}$  М ГТФ.

Рис. 87. Влияние преинкубации на максимальное количество участков связывания  $^3\text{H}$ -альпренолола в мембранах сердца кролика. Мембраны преинкубировали в буферном растворе 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  в отсутствие добавок (1) или при добавлении  $10^{-5}$  М альпренолола (2), ГТФ (3),  $10^{-5}$  М альпренолола +  $10^{-4}$  М ГТФ (4),  $10^{-4}$  М Gpp(NH)p (5),  $10^{-5}$  М альпренолола +  $10^{-4}$  М Gpp(NH)p (6), затем 4 раза отмывали буферным раствором и измеряли связывание  $^3\text{H}$ -альпренолола.

крови вызывает ресенситизацию аденилатциклазной системы в сердце.

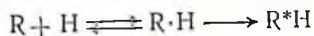
Повышение чувствительности аденилатциклазы к катехоламинам и увеличение количества  $\beta$ -рецепторов может быть достигнуто в экспериментах *in vitro*. Преинкубация мембран с альпренололом в течение 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  и последующее отмывание антагониста приводит к развитию эффектов, подобных тем, которые наблюдаются после инъекции кроликам резерпина: снижается степень активации аденилатциклазы гуаниловыми нуклеотидами и увеличивается активирующее действие изопротеренола (рис. 86). Параллельно этому возрастает количество  $\beta$ -адренергических рецепторов в мембране (рис. 87). Преинкубация мембран с гуаниловыми нуклеотидами в отсутствие гормона не вызывает ресенситизации аденилатциклазной системы. В то же время гуаниловые нуклеотиды способствуют развитию эффекта ресенситизации, происходящему под действием альпренолола (рис. 87). Это свидетельствует, что ГТФ-связывающий белок играет важную роль и в десенситизации и в ресенситизации аденилатциклазной системы к катехоламинам.

В литературе описаны процессы привыкания тканей (жировые клетки, печень, эритроциты, органы воспроизведения) к действию инсулина, катехоламинов, ростового гормона и др. [13—15]. Во всех случаях эффект развивался вследствие продолжительного (4—24 ч) действия гормонов на ткань. Отличитель-

ной особенностью всех десенситизированных тканей являются сниженное количество рецепторов и слабая активация аденилатциклазы гормоном. Авторы отмечают, что активность базальной и NaF-стимулируемой аденилатциклазы в десенситизированных тканях остается неизменной.

Мы обнаружили, что десенситизация подвергается аденилатциклазная система сердца. Этот процесс обратим как *in vivo* (под действием резерпина), так и *in vitro* (вследствие преникубации мембран с альprenололом или альprenололом + гуаниловыми нуклеотидами). Следовательно, уменьшение количества рецепторов, происходящее при десенситизации тканей, может быть объяснено их «маскировкой», а не разрушением, а потеря чувствительности аденилатциклазы к гормону связана с какими-то структурно-функциональными перестройками фермент-рецепторного комплекса. Важную роль в этом процессе играет ГТФ-связывающий белок, поскольку в десенситизированной ткани ГТФ и Gpp(NH)p вызывают более выраженную активацию аденилатциклазы (см. рис. 82—84) и ускоряют развитие ресенситизации (см. рис. 87).

Обязательным условием развития десенситизации является продолжительное действие гормона на ткань. Антагонисты гормонов препятствуют этому процессу. Десенситизация может быть достигнута как *in vivo*, так и *in vitro* (при длительной инкубации мембран с гормоном) [13—15]. Поэтому можно думать, что при длительном воздействии гормона на рецептор он переходит в активированное состояние:



или



Если «активированный» рецептор может взаимодействовать с аденилатциклазой (AC):



то десенситизированным можно назвать такое состояние аденилатциклазной системы, в котором активация фермента может быть достигнута без добавления гормона.

Согласно модели Родбелла [7—8, 10], для перехода аденилатциклазы в активированное состояние необходимо взаимодействие фермента с гормональным рецептором и ГТФ-связывающим белком. Если в десенситизированной ткани аденилатциклаза «преактивирована» рецептором, то активация фермента гуаниловым нуклеотидом должна наступать и в отсутствие добавленных гормонов. Действительно, мы видим (см. рис. 82—84, 86), что «десенситизированная» аденилатциклаза активируется гуаниловыми нуклеотидами в большей степени, чем «ресенситизированная» аденилатциклаза.

Исследованная нами аденилатциклазная система состоит из нескольких белковых компонентов, характер взаимодействия которых существенно зависит от других мембранных структур. Истинные механизмы сопряжения  $\beta$ -рецепторов с аденилатциклазой, развития процессов десенситизации и ресенситизации могут оказаться более сложными. Согласно данным, приведенным в этой работе, одними из наиболее важных участников этих процессов являются гуаниловые нуклеотиды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murad F., Chi Y.-M., Rall T. W., Sutherland E. W. Adenyl cyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3', 5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver.—*J. Biol. Chem.*, 1962, 237:1233—1238.
2. Levitzki A., Atlas D., Steer M. L. The binding characteristics and number of beta-adrenergic receptors on the turkey erythrocyte.—*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1974, 71:2773—2776.
3. Aurbach G. D., Fedak S. A., Woodard C. J., Palmer J. S., Hauser D., Troxler F.  $\beta$ -adrenergic receptor: stereospecific interaction of iodinated  $\beta$ -blocking agent with high affinity site.—*Science*, 1974, 186:1223—1224.
4. Lefkowitz R. J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M. G. Stereospecific  $^3\text{H}$ -alprenolol binding sites, beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60:703—709.
5. Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I. ACTH-receptor interaction in the adrenal A model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, 185:195—209.
6. Lefkowitz R. J. Heterogeneity of adenylate cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptors.—*Biochem. Pharmacol.*, 1975, 24:583—590.
7. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J. The glucagon-sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action.—*J. Biol. Chem.*, 1971, 246:1877—1882.
8. Rodbell M. On the mechanism of activation of fat cell adenylate cyclase by guanine nucleotides. An explanation for the biphasic inhibitory and stimulatory effects of the nucleotides and the role of hormones.—*J. Biol. Chem.*, 1975, 250:5826—5834.
9. Lefkowitz R. J., Williams L. T. Catecholamine binding to the beta-adrenergic receptor.—*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977, 74:515—519.
10. Rodbell M., Lin M. C., Salomon Y. Evidence for interdependent action of glucagon and nucleotides on the hepatic adenylate cyclase system.—*J. Biol. Chem.*, 1974, 249:59—65.
11. Cassel D., Selinger Z. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 452:538—551.
12. Pfeuffer T. GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity.—*J. Biol. Chem.*, 1977, 252:7224—7234.
13. Lesniak M. A., Gorden P., Roth J., Gavin J. R. Binding  $^{125}\text{I}$ -human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes.—*J. Biol. Chem.*, 1974, 249:1661—1667.
14. Mickey J., Tate R., Lefkowitz R. J. Subsensitivity of adenylate cyclase and decreased beta-adrenergic receptor binding after chronic exposure to (—)-isoproterenol in vitro.—*J. Biol. Chem.*, 1975, 250:5727—5729.
15. Lefkowitz R. J., Limbird L. E., Mukherjee C., Caron M. G. The beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 457:1—39.

## СИНТЕЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ТОНУСА СОСУДОВ И ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Ф. НИДЛМАН (PH. NEEDLEMAN) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

Мы обнаружили совершенно новый путь метаболизма арахидоновой кислоты в интактных перфузируемых сердцах и в изолированных коронарных сосудах человека, который приводит к образованию сильнодействующего лабильного коронародилатирующего вещества. Исходя из анализа химической структуры, основным продуктом превращения арахидоновой кислоты в коронарных сосудах сердца является 6-кето-PGF<sub>1α</sub>. Лабильный дилататор выступает в коронарном русле как естественный физиологический антагонист тромбоксана A<sub>2</sub>, образующегося в тромбоцитах (мощный лабильный сосудосуживающий агент; вещество, вызывающее агрегацию). Действительно, тонус коронарных сосудов и, вероятно, спазм в ишемизированной зоне миокарда в значительной степени регулируются взаимодействием между производными арахидоновой кислоты, образующимися в стенке сосуда, с одной стороны, и в тромбоцитах — с другой. Vane и соавт. в сотрудничестве с компанией «Upjohn Company» идентифицировали лабильное вещество в стенке сосуда (простаглицлин — PGI<sub>2</sub>) и обнаружили, что оно подавляет агрегацию тромбоцитов. Это соединение распадается до 6-кето-PGF<sub>1α</sub>. По нашим данным, метаболит арахидоновой кислоты из сердца и коронарных сосудов действительно подавляет агрегацию тромбоцитов и обладает всеми свойствами простаглицлина. Таким образом, нам удалось показать, что синтез PGI<sub>2</sub> в сердце происходит только в стенках коронарных сосудов.

Мы стали углубляться в исследование метаболизма арахидоновой кислоты в тромбоцитах и в стенках кровеносных сосудов и их взаимодействия. В противоположность существующей, по в основном неподтвержденной гипотезе мы показали, что интактные перфузируемые сосуды не превращают PG-эндоперекиси в PGI<sub>2</sub>. Кроме того, наличие эндотелиальных клеток не обязательно для синтеза PG стенкой сосуда, тогда как кровеносные сосуды легко синтезируют как PGI<sub>2</sub>, так и PGE<sub>2</sub> из эндогенного субстрата. Более того, тромбоксан A<sub>2</sub> (а не PG-эндоперекиси) является основным производным арахидоновой кислоты, образующимся во время агрегации (взаимодействие тромбоцит — тромбоцит) или адгезии (взаимодействие тромбоцит — стенка сосуда) тромбоцитов *in vitro*, что, таким образом, отвергает возможность использования сосудами тромбоцитарного PGG<sub>2</sub> для синтеза PGI<sub>2</sub>. Путем ингибирования синтеза тромбоксана в тромбоцитах во время

адгезии мы, однако, облегчили образование простаглицлина в сосудах и тем самым добились локальной дилатации и дезагрегации на участке тромбообразования.

Совсем недавно мы изучили уникальные биологические свойства нового семейства простаглицлинов (триены). Мы обнаружили, что жирная кислота-предшественник, эйкозапентаеновая кислота, легко включается в фосфолипиды тромбоцитов и высвобождается при обработке тромбоцитов агрегирующими веществами. Кроме того, эта жирная кислота оказалась эффективным конкурентом арахидоновой кислоты за два ключевых фермента тромбоцитов (циклооксигеназа и липоксигеназа). Часть высвобождаемой эйкозапентаеновой кислоты превращается тромбоцитами человека в  $PGH_2$  и тромбоксан  $A_2$ , каждый из которых увеличивает уровень цАМФ и тем самым ингибирует агрегацию; кроме того, они подавляют активность тромбоцитарной фосфолипазы. Таким образом, триеновые простаглицлины являются потенциальными средствами, предотвращающими тромбообразование, так как их жирная кислота-предшественник (которая может поступать с пищей), как и продукты ее превращения ( $PGH_2$ , тромбоксан  $A_2$  и  $PGI_2$ ), препятствуют агрегации тромбоцитов человека.

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ПРОСТАГЛИКЛИНА В СЕРДЦЕ И КОРОНАРНЫХ СОСУДАХ

### Влияние синтеза PG на сопротивление коронарных сосудов

Мы обнаружили, что простаглицлин E-подобные вещества (PLS), определяемые методом биологического тестирования, по-видимому, являются эндогенными медиаторами вазодилатации коронарных сосудов изолированного перфузируемого сердца кролика при действии некоторых мощных вазоактивных веществ, включая арахидоновую кислоту, брадикинин или ангиотензин II [1, 2], поскольку: а) концентрация PLS в жидкости, оттекающей из коронарных вен, прямо пропорциональна концентрации коронарных вазодилатирующих веществ (брадикинин, ангиотензин II или арахидоновая кислота); б) выброс PLS и расширение коронарных сосудов, вызываемое этими агентами, коррелирует как во времени, так и количественно; в) прекращение биосинтеза PLS с помощью индометацина предотвращает уменьшение сопротивления коронарных сосудов при действии этих агентов.

Как это ни странно, мы показали, что  $PGE_2$  в концентрациях, равных или выше концентрации PG в жидкости, оттекающей от сердца, не вызывает расширения коронарных сосудов [2]. Одним из возможных объяснений может быть то, что расширение их, вызываемое арахидоновой кислотой, связано с образованием не-стабильных промежуточных продуктов, эндоперекисей  $PGG_2$  или  $PGH_2$ , а не  $PGE_2$ . Тем не менее никаких эндоперекисей не было

обнаружено в жидкости, оттекающей из коронарных сосудов при перфузии сердца арахидоновой кислотой [2]. Другая возможность — существование необычных простагландинов, вызывающих уменьшение сопротивления этих сосудов (что действительно имеет место). Третье объяснение — место биосинтеза PG совпадает или расположено очень близко от места их действия в случае гладких мышц коронарных сосудов.

### Нарадоксальный эндогенный синтез в коронарных сосудах коронародилатирующих веществ из арахидоновой кислоты и PG эндоперекисей

Мы установили, что изолированные спиральные полоски коронарной артерии быка и человека сокращаются под действием  $PGE_2$  [3]. Ингибирование PG-циклооксигеназы ацетилсалициловой кислотой или индометацином приводит к быстрому и выраженному увеличению коронарного тонуса, что предполагает наличие постоянного синтеза эндогенного сосудорасширяющего PG. Неожиданно мы обнаружили, что хотя основной простагландин  $PGE_2$  является вазоконстриктором, введение его предшественника, арахидоновой кислоты, вызывает дилатацию коронарных артерий человека, быка или собаки [3]. Эти важные эксперименты показывают, что арахидонат не преобразуется коронарными артериями в  $PGE_2$ . Тем не менее расслабление, вызванное арахидоновой кислотой, можно предотвратить путем предварительной обработки органа ингибиторами PG-циклооксигеназы. Более того, добавление индометацина к уже релаксировавшим в результате обработки арахидоновой кислотой полоскам сосудистой стенки вызывает сокращение [3]. Расслабление, по-видимому, обусловлено образующимися из арахидоновой кислоты нестабильными эндоперекисями  $PGG_2$  или  $PGH_2$ . При однократном введении (bolus injection)  $PGH_2$  в перфузирующую жидкость каскада грудной аорты кролика, мы неожиданно обнаружили, что  $PGH_2$  вызывает зависящее от концентрации расслабление полоски коронарной артерии быка, но сокращение аорты кролика [4]. Аналогичные результаты были получены с  $PGH_3$  (промежуточное соединение при превращении эйкозапентаеновой кислоты в  $PGE_3$ ). Наоборот,  $PGH_1$  (промежуточный продукт превращения дигомо-γ-линоленовой кислоты в  $PGE_1$ ), который не содержит двойной связи 5=6, вызывает зависящее от дозы сокращение полосок коронарных артерий быка, коронарных сосудов свиньи и аорты кролика [4]. Таким образом,  $PGH_2$  и  $PGH_3$  обуславливают зависящее от дозы расслабление полосок коронарной артерии быка, тогда как  $PGH_1$  вызывает коронароконстрикцию. Основные простагландины оказывают прямо противоположное эффектам их предшественников эндоперекисей. Так,  $PGH_2$  и  $PGE_3$  сокращают, а  $PGE_1$  расслабляет коронарные артерии быка.

Хотя коронарные сосуды быка не обладают тромбоксиантетазной активностью, они сильно сокращаются под действием экзогенного тромбксана  $A_2$  [4]. Расслабление коронарных артерий человека и быка, вызываемое арахидоновой кислотой и PG-эндоперекисью, предполагает по крайней мере две возможности. Сосуд может иметь циклооксигеназу, но не обладать  $PGH_2$ - $PGE_2$ -изомеразой. Тогда при отсутствии ферментативного образования основных простагландинов будут накапливаться эндоперекиси  $PGH_2$  и  $PGG_2$ , вызывающие расширение сосудов. Наряду с этим в коронарных артериях быка, возможно, образуется необычное PG-подобное вещество. Действительно, дальнейшие исследования ясно показали, что коронарные сосуды, многие кровеносные сосуды и другие ткани обладают ферментом, который катализирует образование лабильного мощного коронародилатирующего вещества из  $PGH_2$ .

### Химическая характеристика нового метаболического пути

Расслабление коронарных сосудов в присутствии арахидоновой кислоты и  $PGH_2$  предполагает, что эти вещества, возможно, превращаются в другие PG, а не в  $PGE_2$ . Поэтому мы исследовали метаболизм  $^{14}C$ -арахидоновой кислоты полосками коронарной артерии быка. Инкубация предварительно меченых  $^{14}C$ -арахидоновой кислотой коронарных артерий быка в течение 4—5 ч приводила к постепенному высвобождению PGE-подобного вещества в среду [5]. Экстракция кислых липидов из перфузионной среды с последующим разделением методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей «С» (хлороформ : метанол : уксусная кислота : вода — 90 : 8 : 1 : 0,8) позволяет выявить основной радиоактивный продукт, который мигрирует вместе с  $PGE_2$  [5]. Когда экстракт среды, омывающей меченую полоску коронарной артерии, хроматографировали в другой системе растворителей (бензол : диоксан : уксусная кислота — 60 : 30 : 3), пик PGE разделился на два пика: один с хроматографической подвижностью, идентичной  $PGE_2$ , и другой с хроматографической подвижностью, близкой  $PGF_{2\alpha}$  [5]. Отсутствие радиоактивного пика, мигрирующего вместе с  $PGF_{2\alpha}$  в хроматографической системе С, свидетельствует о том, что в коронарных артериях образуется вещество, отличное от  $PGE_2$  или  $PGF_{2\alpha}$ . Обработка щелочью (0,5 М KOH в метаноле) общего пика PGE, выделенного в системе С, ведет только к частичному превращению в  $PGF_2$  [5]. Неизвестное вещество основным простагландином, образующимся в гомогенате дна желудка крысы, который был идентифицирован Pace — Asciak и Wolfe [6] как 6-кето- $PGF_{1\alpha}$ .

Арахидоновая кислота, перфузируемая через изолированное сердце кролика, вызывает расширение коронарных сосудов и од-

повременное появление в оттекающей жидкости PG-подобного вещества [2, 3]. Продукты метаболизма арахидоновой кислоты были изучены путем предварительного мечения фосфолипидов сердца  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислотой по методу, описанному нами ранее [7]. Неожиданно основным продуктом, образующимся в сердце, оказался не  $\text{PGE}_2$ , а новый простагландин [8]. Это вещество, как и вещество из коронарных сосудов, описанное выше, обладало всеми химическими и хроматографическими свойствами 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ . Раньше считали, что коронародилатация, вызываемая в сердце кролика введением арахидоновой кислоты или гормональным воздействием (брадикинин или ангиотензин), связана с образованием  $\text{PGE}_2$  [1, 2, 9]. Так как основным продуктом, синтезируемым в изолированном перфузируемом сердце и полосках коронарных артерий, является не  $\text{PGE}_2$ , можно предположить, что необычный простагландин вызывает коронародилатацию, которая происходит при введении арахидоновой кислоты или брадикинина в интактное сердце.

### Биологическая характеристика уникального PG-коронарного сосудорасширяющего вещества [9, 10]

В экспериментах мы обнаружили, что добавление  $\text{PGH}_2$  вызывает немедленное сокращение полоски грудной аорты кролика и немного отсроченное расслабление коронарной артерии собаки (или быка). То же количество  $\text{PGH}_2$  затем инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре с микросомами из коронарных артерий быка. Активность  $\text{PGH}_2$  (сокращение аорты) исчезла, но наблюдалось быстрое глубокое расслабление коронарных сосудов. Радиоактивный продукт, полученный при длительной (15 мин) инкубации  $^{14}\text{C}$ - $\text{PGH}_2$  с микросомами из кровеносных сосудов, содержал смесь 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  и  $\text{PGE}_2$ . Таким образом, лабильный промежуточный продукт между  $\text{PGH}_2$  и 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  по-видимому, вызывает расслабление коронарных сосудов при введении как арахидоновой кислоты, так и  $\text{PGG}_2$  или  $\text{PGH}_2$ . Инкубация  $\text{PGH}_1$  с микросомами из коронарной артерии быка не приводила ни к исчезновению  $\text{PGH}_1$ -индуцируемого сокращения аорты, ни к изменению сократительного действия на ткань коронарных сосудов. Таким образом, превращение эпидоперекисей в лабильное вещество, вызывающее расслабление, очевидно, требует наличия двойной связи 5 = 6. Эта связь имеется в  $\text{PGH}_2$  и  $\text{PGH}_3$  (который, как мы позже показали, превращается в  $\text{PGI}_3$ , т. е.  $\Delta^{17}$ -простаглин), вызывающих дилатацию коронарных сосудов быка, но отсутствует в  $\text{PGH}_1$ . Мы получили аналогичные результаты и на изолированном перфузируемом сердце кролика.  $^{14}\text{C}$ -арахидоновая кислота превращается в сердце в 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  и  $\text{PGE}_2$ , тогда как  $^{14}\text{C}$ -дигмо- $\gamma$ -липоленовая кислота (предшественник  $\text{PGH}_1$ ) превращается только в  $\text{PGE}_1$  [8]. В исследованиях, выпол-



пенных Vane и соавт., микросомы из кровеносных сосудов (аорта, мезентериальные, брюшные и коронарные артерии), инкубируемые с  $\text{PGH}_2$ , выделяли лабильное вещество, которое, как было установлено, является мощным ингибитором агрегации тромбоцитов [10] и расслабляет гладкие мышцы некоторых сосудов. В этом случае стабильным неактивным метаболитом был 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ . Структура промежуточного продукта была исследована группой Vane в сотрудничестве с компанией «Upjohn Company». Как оказалось, он представляет собой бициклический PG, названный простаглицлином [11] и теперь обозначаемый как  $\text{PGI}_2$ .

### Высвобождение лабильного вазодилатирующего вещества из изолированного перфузируемого сердца кролика [12—14]

Основываясь на радиохимическом обнаружении синтеза 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  в изолированном перфузируемом сердце кролика, мы попытались обнаружить присутствие лабильного интермедата, простаглицлина, в жидкости, вытекающей из вен при гормональной стимуляции сердца. Внутрисердечная инъекция мощного вазоконстриктора ангиотензина II (АП) вызывала уменьшение сопротивления коронарных сосудов в перфузируемом сердце (как и в случае брадикинина) и появление в оттекающей жидкости вещества, расслабляющего коронарные артерии быка. Жидкость, оттекающая от сердца при пептидной стимуляции, подавляла агрегацию отмытой суспензии тромбоцитов человека, вызванную арахидоновой кислотой,  $\text{PGH}_2$ , коллагеном или тромбином. Введение АП в перфузируемое сердце, предварительно обработанное индометацином, увеличивало сопротивление сосудистого русла. Кроме того, никакого вазоактивного PG-подобного вещества в оттекающей жидкости не было. В ранних экспериментах на изолированных сердцах для выявления  $\text{PGE}_2$  использовали прямую кишку цыпленка, желудок и толстый кишечник крысы, так как  $\text{PGE}_2$  вызывает сокращение этих органов. Теперь ясно, что изолированное перфузируемое сердце кролика выделяет смесь  $\text{PGE}_2$  и простаглицлина. Стало ясно, почему введение экзогенного  $\text{PGE}_2$  не уменьшало сопротивления коронарного русла, что наблюдалось при введении арахидоновой кислоты или гормональной стимуляции, так как внутренним коронародилатирующим веществом, образующимся из арахидоновой кислоты или эндоперексидей, является лабильный промежуточный продукт (простаглицлин,  $\text{PGI}_2$ ) между  $\text{PGH}_2$  и 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ .

Наши данные, показывающие, что изолированное сердце кролика способно синтезировать простаглицлин  $\text{PGI}_2$ , включают [5, 8, 12—14]: а) радиохимическое определение стабильного конечного продукта 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  в венозном оттоке из сердца при действии гормона или ишемии; б) биологическую идентификацию в венозном оттоке лабильного продукта, появляющегося при дей-

ствии арахидоновой кислоты, ангиотензина, брадикинина или ишемии и вызывающего расслабление ткани стенки коронарных сосудов быка и подавляющего агрегацию тромбоцитов; в) подтверждение того, что арахидоновая кислота (20 : 4), но не дигомо- $\gamma$ -линоленовая кислота (C20 : 3) служит предшественником коронародилатирующего и антиагрегирующего вещества. Мы пытались избирательно подавить биосинтез PGI<sub>2</sub> путем инфузии 15-гидроперекиси арахидоновой кислоты через сердце или почку. К сожалению, этот агент, по-видимому, не действует на интактные органы (возможно, вследствие недостаточной проницаемости или из-за быстрого ферментативного превращения в 15-гидроксипарахидоновую кислоту), но он блокирует ферментативное образование PGI<sub>2</sub> из PGH<sub>2</sub> *in vitro* микросомами из аорты или коронарных артерий быка. Наконец, введение PGI<sub>2</sub> вызывает уменьшение коронарного перфузионного давления аналогично действию экзогенной или эндогенной арахидоновой кислоты.

### Взаимодействие кровеносный сосуд — тромбоцит

Мы обнаружили, что кровеносные сосуды обладают способностью к синтезу сосудорасширяющих простагландинов и, таким образом, могут локально регулировать сосудистый тонус [15]. Основным PG сосудов, как было показано, является простаглицлин или его стабильный метаболит 6-кето-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> . Простаглицлин (PGI<sub>2</sub>) существенно подавляет агрегацию тромбоцитов [10] и, следовательно, становится первым кандидатом на роль регулятора процессов образования тромба. Препараты изолированных кровеносных сосудов весьма неэффективно (5%) превращают экзогенную арахидоновую кислоту с помощью фермента циклооксигеназы в PG-эндоперекись. При этом простаглицлинсинтетаза сосудистой ткани успешно (80%) метаболизирует экзогенные или эндогенные PG-эндоперекиси в PGI<sub>2</sub>. Наряду с этим тромбоциты обладают очень активной циклооксигеназой, легко циклизующей арахидонат в эндоперекись, которая в свою очередь превращается в тромбоксан A<sub>2</sub> — вещество с выраженным агрегирующим и вазоконстрикторным действием. Группа Vane [16] провела эксперименты по смешиванию и обнаружила, что сегменты кровеносных сосудов, предварительно обработанные индометацином (обратимый ингибитор циклооксигеназы), при перемешивании с обогащенной тромбоцитами плазмой предотвращают агрегацию. Поэтому они предложили гипотезу, что при агрегации из тромбоцитов освобождаются эндоперекиси, используемые затем стенкой сосуда для синтеза простаглицлина. Такой обмен продуктами одновременно представляет собой метаболический путь в обход неэффективной циклооксигеназы сосудов и лишает тромбоциты субстрата для синтеза тромбксана. Таким образом, процесс образования тромба и тонус сосудов могут регулироваться локальным соотношением простаглицлин сосудов/тромбоксан тромбоцитов. Поэтому изучение

метаболизма арахидоновой кислоты в стенке сосудов и в тромбоцитах, а также их взаимодействие стало в центре внимания нашего исследования.

Мы показали [17], что экзогенный  $^{14}\text{C}$ -арахидонат, добавленный к интактным тромбоцитам человека в присутствии микросом из кровеносных сосудов (источник простаглицлисинтетазы), превращался только в  $^{14}\text{C}$ -тромбоксан  $\text{B}_2$ . PG-эндоперекиси высвобождались из интактных тромбоцитов лишь в том случае, если синтез тромбоксана был подавлен имидазолом, который, как установлено [18], является антагонистом тромбоксансинтетазы, и тогда микросомы кровеносных сосудов превращали образовавшиеся эндоперекиси в  $\text{PGI}_2$ . Кроме того, инкубация интактных или активированных тромбином тромбоцитов человека, которые содержат в составе фосфолипидов  $^{14}\text{C}$ -арахидоновую кислоту, с интактной аортой кролика, обработанной ацетилсалициловой кислотой, ведет к немедленной адгезии [17]. Единственным циклическим продуктом метаболизма арахидоновой кислоты, образующимся при такой адгезии тромбоцитов на стенке сосуда, был меченый тромбоксан, тогда как меченый 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$  не был обнаружен. Стимуляция тромбином тромбоцитов, обработанных имидазолом, ведет к образованию меченых PG-эндоперекисей, которые превращаются простаглицлисинтетазой сосудов в меченый  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Сравнимые результаты были получены [19] при инкубации культуры гладкомышечных клеток артерий человека и венозных эндотелиальных клеток с тромбоцитами человека в присутствии арахидоновой кислоты и определяли образование  $\text{PGI}_2$  методом биологического тестирования (т. е. ингибирование выброса  $^{14}\text{C}$ -серотонина из тромбоцитов). Значительный синтез простаглицлина из PG-эндоперекисей тромбоцитов в клетках культуры, обработанных ацетилсалициловой кислотой, наблюдали только в тех случаях, когда был подавлен синтез тромбоксана. Эти результаты свидетельствуют против предположения о получении кровеносными сосудами эндоперекисей из тромбоцитов для последующего синтеза  $\text{PGI}_2$ , что предохраняет от осаждения кровяных пластинок на стенках сосудов. К счастью, эти эксперименты обнажили возможную стратегию фармакологии (которой мы собираемся следовать), открывающую пути для терапевтического (например, при тромбозах, коронарном или церебральном вазоспазме и, возможно, атеросклерозе) влияния на взаимодействие тромбоцита со стенкой сосуда путем локального увеличения отношения простаглицлин/тромбоксан. Так, разработка ингибитора тромбоксансинтетазы, эффективного *in vivo*, может усилить выброс эндоперекисей из тромбоцитов и снабжение ими простаглицлисинтетазы сосудов. Ингибитор тромбоксансинтетазы способен избирательно стимулировать выработку простаглицлина только в местах критического взаимодействия, так как именно повреждение сосуда вызывает адгезию и агрегацию тромбоцитов. Первоначально полагали, что основным источником антитромботического  $\text{PGI}_2$  яв-

являются клетки эндотелия, поэтому потеря их при повреждении сосуда вызовет местный тромбоз [20]. Однако субэндотелиальные гладкомышечные клетки легко образуют простаглин при условиях, которые способствуют тромбообразованию [21]. Если повреждение эндотелия кровеносных сосудов (*in vivo*) способствует синтезу  $PGI_2$ , трудно примириться с тем, что это вещество является основным средством предотвращения тромбообразования.

### Открытие триеновых PG и их функционирование

Ранее мы показали [22], что 5, 8, 11, 14, 17-эйкозапентаеновая кислота ( $C_{20}:5$ ) превращается циклооксигеназой из семенных желез барапа в нестойкое вещество, вызывающее сокращение, которое представляет собой смесь простагландинов (PG), эндоперексидов  $PGC_3$  и  $PGH_3$  [22]. Эти эндоперексиды затем ферментативно превращаются микросомами тромбоцитов в мощный, но нестойкий вазоконстриктор, который, по-видимому, является тромбоксаном  $A_2$  [22, 23]. Кроме того, нанесение очищенного  $PGH_2$  (образующегося из арахидоновой кислоты) или  $PGH_3$  на изолированные спиральные полоски коронарных артерий быка вызывало временное расслабление, тогда как  $PGH_1$  (образующийся из 8, 11, 14-эйкозатриеновой кислоты) ведет к сокращению полоски коронарных сосудов [13, 14]. Как показано выше, основным продуктом, вырабатываемым коронарными артериями быка или изолированным перфузируемым сердцем кролика из  $^{14}C$ -арахидоновой кислоты, был 6-кето- $PGF_{1\alpha}$  — стабильный конечный продукт, образующийся из простагличина  $PGI_2$ , тогда как  $^{14}C$ -эйкозатриеновая кислота превращается только в PGE. Эти данные показывают, что для синтеза простагличина необходимо наличие в PG-эндоперексиде  $\Delta^5$  — двойной связи. Таким образом,  $PGH_2$  является предшественником  $PGI_2$  и его стабильный конечный метаболит 6-кето- $PGF_{1\alpha}$ , и  $PGH_3$ , который обладает выраженным коронародилатирующим свойством, по-видимому, превращается в  $PGI_3$  и в конечном счете распадается до  $\Delta^{17}$  6-кето- $PGF_1$ . Тем не менее никаких прямых химических или биологических доказательств наличия последнего метаболического пути до сих пор не приводилось.

Сравнительное изучение действия метаболитов арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот на тромбоциты в плазме, обогащенной тромбоцитами (PRP), дало неожиданные результаты. Арахидоновая кислота,  $PGH_2$  и тромбоксан  $A_2$  являются мощными агрегирующими агентами по отношению к тромбоцитам человека, но эйкозапентаеновая кислота,  $PGH_3$  или тромбоксан  $A_3$ , наоборот, не вызывает агрегацию тромбоцитов [22, 23]. Недавно последнее предположение получило, по-видимому, физиологическое подтверждение. Было установлено, что у эскимосов, которые страдают склонностью к кровотечениям, имеется увеличенное содержание эйкозапентаеновой кислоты и уменьшенное содержание

арахидоновой кислоты в липидной фракции крови [24]. Было высказано предположение, что склонность к кровотечениям вызвана увеличенным синтезом  $PGI_3$ . Тем не менее никаких прямых данных синтеза  $PGI_3$ , таких, как выделение и хроматографическое изучение продуктов или подавление синтеза антитромботического вещества ингибитором простаглицинсинтетазы, например 15-гидропероксиарахидоновой кислотой, приведено не было. Кроме того, не было получено данных, доказывающих, что кровотечение у эскимосов связано с дефектом тромбоцитов, а не с другими нарушениями механизма свертывания.

Мы использовали  $^{14}C$ -эйкозапентаеновую кислоту и осуществили биологическое и химическое тестирование синтеза  $PGH_3$  или его неактивного метаболита  $\Delta^{17}$ -6-кето- $PGF_{1\alpha}$  и тромбоксана  $A_3$  или его метаболита тромбоксана  $B_3$ . Далее мы исследовали упикальное действие триеновых простаглицидов на плазму человека, обогащенную тромбоцитами, и показали наличие внутреннего тромбоцитарного механизма, с помощью которого  $PGH_3$  или тромбоксан  $A_3$  ингибирует агрегацию, вызываемую агрегирующими агентами [25]. Мы нашли, что 5, 8, 11, 14, 17-эйкопентаеновая кислота (C20:5) превращается циклооксигеназой семянных пузырьков барана в смесь  $PG$ -эндоперексидей,  $PGH_3$  и  $PGG_3$  [25]. В тромбоцитах  $PGH_3$  ферментативно превращается в тромбоксан  $A_3$ . Обычные метаболиты арахидоновой кислоты  $PGH_2$  и тромбоксан  $A_2$  in vitro агрегируют плазму человека, обогащенную тромбоцитами. Наоборот,  $PGH_3$  и тромбоксан  $A_3$  не обладают таким свойством. Добавление экзогенного  $PGH_3$  и тромбоксана  $A_3$  увеличивает уровень цАМФ в плазме, обогащенной тромбоцитами, и тем самым: а) подавляют агрегацию, вызываемую всеми другими агентами (например, АДФ, тромбином, коллагеном); б) блокируют реакцию выброса, вызываемую АДФ; в) подавляют активность тромбоцитарной фосфолипазы  $A_2$ .  $PGI_3$  ( $\Delta^{17}$ -простаглицин) синтезируется из  $PGH_3$  ферментом кровеносных сосудов и оказывает то же действие, что и  $PGI_2$ . Оба соединения являются мощными васкулярными релаксантами сосудов, ингибируют агрегацию в плазме человека, обогащенной тромбоцитами, и увеличивают аденилатциклазную активность тромбоцитов. Радиоактивные эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты одинаково легко встраиваются в фосфолипиды тромбоцитов; кроме того, стимуляция тромбином предварительно меченных тромбоцитов вызывает выделение сравнимых количеств эйкозапентаеновой и арахидоновой кислот соответственно. Хотя эйкозапентаеновая кислота является относительно более слабым субстратом для циклооксигеназы тромбоцитов, она, по-видимому, обладает высоким средством и поэтому подавляет превращение арахидоновой кислоты циклооксигеназой и липоксигеназой тромбоцитов. Возможно, что триеновые простаглициды — потенциальные антитромботические агенты, так как их жирная кислота-предшественник, как и продукты превращения  $PGH_3$ , тромбоксан

сан  $A_3$  (возможно, опосредованно через  $PGD_3$ ) и  $PGI_1$ , способны препятствовать агрегации тромбоцитов в плазме, обогащенной тромбоцитами.

Кроме того, недавно полученные данные позволяют предположить, что другой триеновый продукт —  $PG$ , действительно может быть активным противосвертывающим членом этого «семейства», вызывающим подавление агрегации тромбоцитов. Это последнее вещество —  $PGI_2$  с антисвертывающими свойствами, который в отличие от  $PGI_1$  не вызывает выраженной вазодилатации, находится сейчас в фокусе наших исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Needleman P., Key S. L., Denny S. E., Isakson P. C., Marshall G. R. The mechanism and modification of bradykinin induced coronary vasodilation.—Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1975, 72:2060—2063.
2. Needleman P., Marshall G. R., Sobel B. E. Myocardial hormone interactions: Synthesis, inactivation and coronary vasomotor effects of prostaglandins, angiotensin, and bradykinin.—Circ. Res., 1975, 37:802—808.
3. Kulkarni P. S., Roberts R., Needleman P. Paradoxical endogenous synthesis of a coronary dilating substance from arachidonate.—Prostaglandins, 1976, 12:337—353.
4. Needleman P., Raz A., Kulkarni P. S., Wyche A., Denny S. Prostaglandin  $I_2$  synthesis and vascular effects in isolated coronary artery. In Mechanisms of Vasodilation, edited by P. M., Vanhoutte, I., Lensen, Basel, Karger, 1978, pp. 122—128.
5. Raz A., Isakson P. C., Minkes M. S., Needleman P. Characterization of a novel metabolic pathway of arachidonate in coronary arteries which generates a potent endogenous coronary vasodilator.—J. Biol. Chem., 1977, 252:1123—1126.
6. Pace-Asciak C., Wolfe L. S. A novel prostaglandin derivative formed from arachidonic acid by rat stomach homogenates.—Biochemistry, 1971, 10: 3657—3664.
7. Isakson P. C., Raz A., Needleman P. Selective incorporation of  $^{14}C$ -arachidonic acid into the phospholipids of intact tissues and subsequent metabolism to  $^{14}C$ -prostaglandins.—Prostaglandins, 1976, 12:739—748.
8. Isakson P. C., Raz A., Denny S. E., Pure E., Needleman P. The major product of arachidonic acid metabolism in rabbit heart.—Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1977, 74:101—103.
9. Needleman P. The synthesis and function of prostaglandins in the heart.—Fed. Proc., 1976, 35:2376—2381.
10. Moncada S. R., Gryglewski R., Bunting S., Vane J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.—Nature, 1976, 263:633—635.
11. Johnson R. A., Morton D. R., Kinner J. H., Gorman R. R., McGuire J. C., Sun F. F., Whittaker N., Bunting S., Salmon J., Moncada S., Vane J. R. The chemical structure of prostaglandin X (prostaglyclin).—Prostaglandins, 1976, 12:915—928.
12. Needleman P., Bronson S. D., Wyche A., Nicolau K. C., Sivakoff M. Cardiac and renal prostaglandin  $I_2$ : Biosynthesis and biological effects.—J. Clin. Invest., 1977, 61:839—849.
13. Needleman P., Raz A., Kulkarni P. S., Pure E., Wyche A., Denny S. E., Isakson P. Biological and chemical characterization of a unique endogenous vasodilator prostaglandin produced in isolated coronary artery and in intact perfused heart. In Biochemical Aspects of Prostaglandins and Thromboxanes, Proceedings of the 1976 Intra—Science Research Founda-

- tion Symposium, December 1—3, Santa Monica, California, edited by N. Kharasch, J. Fried., New York, Academic Press, 1977.
14. Needleman P., Kulkarni P. S., Raz A. Coronary tone modulation: Formation and actions of prostaglandins, endoperoxides, and thromboxanes.—*Science*, 1977, 195:409—412.
  15. Needleman P., Marshall G. R., Douglas J. R. Prostaglandin release from vasculature induced by angiotensin II.—*Eur. J. Pharmacol.*, 1973, 66:316—319.
  16. Bunting S. R., Gryglewski R., Moncada S., Vane J. R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation.—*Prostaglandins*, 1976, 12:897—915.
  17. Needleman P., Wyche A., Raz A. Platelet and blood vessel arachidonate metabolism.—*J. Clin. Invest.*, 1979, 63:345—349.
  18. Needleman P., Raz A., Ferrendelli J. A., Minkes M. Application of imidazole as a selective inhibitor of thromboxane synthetase in human platelets.—*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977, 74:1716—1720.
  19. Baenziger N. L., Becherer P. R., Majerius P. W. PGI<sub>2</sub> production in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts.—*Cell*, 1979, 16:967—974.
  20. Moncada S., Herman A. G., Higgs E. A., Vane J. R. Differential formation of prostacyclin by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium.—*Thromb. Res.*, 1977, 11: 323—344.
  21. Puré E., Needleman P. Effect of endothelial damage on prostaglandin synthesis by isolated perfused rabbit mesenteric vasculature.—*J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1979, 1:299—309.
  22. Needleman P., Minkes M., Raz A. Thromboxanes: Selective biosynthesis and distinct biological properties.—*Science*, 1976, 193:163—165.
  23. Raz A., Minkes M. S., Needleman P. Endoperoxides and thromboxanes: Structural determinants for platelet aggregation and vasoconstriction.—*Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 488:305—311.
  24. Dyerberg J., Bang H. O., Stoffersen E., Moncada S., Vane J. R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis.—*Lancet*, 1978, 11:117—119.
  25. Needleman P., Raz A., Minkes M. S., Ferrendelli J. A., Sprecher H. Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties.—*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1979, 76:944—948.

УДК 616.12-008.66-092:[616.12-008.94:577.175.859+616.12-008.939.633.2]-074

## ПРОСТАГЛАНДИНЫ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СЕРДЦА К ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕРЕГРУЗКЕ ДАВЛЕНИЕМ

В. Д. ПОМОЙНЕЦКИЙ, Н. Г. ГЕЛИНГ, А. Л. НЕКРАСОВА, Ц. Р. ОРЛОВА,  
Н. М. ЧЕРПАЧЕНКО, С. А. КУДРЯШОВ, Д. С. БЕНЕВОЛЕНСКИЙ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы показано, что простагландины (PG) наряду с локальной регуляцией миокардиального кровотока [1—5] оказывают положительное инотропное и хронотропное действие на сер-

дечную мышцу [1, 6—8]. Наблюдаемое при этом увеличение силы сокращения миокарда, так же как и в случае влияния шотронных агентов, связано с повышением концентрации циклического 3',5'-АМФ [9—11] в результате активации аденилатциклазы сердца [9, 11—13]. Данные о синтезе РГ в самом сердце [3, 14] свидетельствуют о том, что они, вероятно, являются физиологическими регуляторами работы сердца. Синтезируемые в самом миокарде РГ могут оказывать и не прямое модулирующее влияние на сократительную активность сердца и коронарный кровоток [16], контролируя освобождение нейротрансмиттеров на пресинаптическом уровне [16, 17].

При патологии сердца, моделируемой в условиях *in vivo* и *in vitro* могут происходить нарушения в системе синтеза и выделения РГ из миокарда [3, 17—21]. Биосинтез и выделение РГ из миокарда перфузируемых сердец кролика увеличивается при различных стимулах (механическое раздражение левого желудочка резиновым баллончиком, гипоксией и аноксией) и уменьшается при фибрилляции сердца [17—19]. Последние авторы также заметили, что увеличение выброса РГ в перфузат сопровождается одновременным повышением сократительной активности сердца. Введение РГ ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$ ) при аритмиях, вызываемых различными агентами, нормализует сердечный ритм и работу сердца [6, 21—25].

Лимас и соавт. [21] обнаружили прямую зависимость между увеличением синтеза РГ при 5-минутной коарктации восходящей дуги аорты у крысы и активностью аденилатциклазы.

Данные литературы [1—21] позволяют предположить, что РГ имеют непосредственное отношение к регуляции биохимических процессов, лежащих в основе адаптации сердца к экстремальным воздействиям. Свое влияние на метаболизм миокарда они, по-видимому, осуществляют через систему циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ).

Исходя из этих предпосылок, задачи нашего исследования можно сформулировать так: 1) изучить изменение содержания РГЕ и РГ $F_{2\alpha}$  в левом желудочке сердца кроликов при острой перегрузке сердца, вызванной дозированной сужением восходящей дуги аорты, и выяснить, имеется ли какая-либо корреляция между сократимостью сердца и эндогенным уровнем РГ в нем; 2) исследовать характер взаимоотношений между РГ и циклическими нуклеотидами (цАМФ и цГМФ) в процессе адаптации сердца крысы к острой и хронической перегрузке давлением.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первая часть работы была выполнена на 53 кроликах-самцах породы шиншилла с массой 2,5—3 кг. Животных наркотизировали внутривенным введением барбитала (50—60 мг на 1 кг мас-



сы). Опыт проводили в условиях открытой грудной клетки и искусственной вентиляции легких.

В ходе эксперимента регистрировалось давление в левом желудочке (систолическое и диастолическое) электроманометрами фирмы «Eleta» (США), первая производная внутрижелудочкового давления ( $dp/dt$ ) и рассчитывался индекс сократимости ( $dp/dt/p$ ). Запись регистрируемых параметров проводили на мифографе при скорости движения бумаги 3 и 300 мм/с.

Важно подчеркнуть, что перегрузка давлением была строго стандартизована для всех животных. С этой целью коарктацию восходящей дуги аорты осуществляли так, чтобы отношение систолического давления, развиваемого левым желудочком (ЛЖСД), к величине его максимального давления ( $P_{\max}$ ), определяемого при полном пережатии аорты, было сопоставимо у разных животных при различных величинах исходного давления.  $P_{\max}$  определяли у каждого животного при полном пережатии аорты на 1—2 сокращения сердца. Затем после периода стабилизации гемодинамических показателей у подопытных кроликов с помощью винтового зажима проводили дозированное сужение восходящей части дуги аорты так, чтобы ЛЖСД составляло 80% от величины  $P_{\max}$  у данного животного. В течение всего времени наблюдения (0—60 мин) непрерывно регистрировали гемодинамические показатели левого желудочка сердца у кролика. Для контрольной группы животных были соблюдены те же условия опыта, но без сужения аорты («ложнооперированные»).

В разные сроки от начала коарктации аорты левый желудочек сердца быстро извлекали, замораживали предварительно охлажденными в жидком азоте щипцами Волленбергера [26] и использовали для определения тканевого содержания РГ.

Во второй части работы было использовано 80 крыс-самцов породы Вистар с массой 140—160 г. Компенсаторную гиперфульсию и гипертрофию миокарда вызывали коарктацией брюшной аорты, используя металлическую пружинку для сужения аорты в 2—3 раза. Гипертрофию сердечной мышцы оценивали по увеличению относительной массы сердца после создания экспериментального стеноза аорты. В качестве контроля были взяты 24 «ложнооперированные» крысы.

Концентрацию РГ ( $E$  и  $F_{2\alpha}$ ) в сердце определяли в различные сроки после создания стеноза (через 15, 30 и 60 мин у кроликов и через 5, 15 и 40 мин, 1,2—30½ ч, 1, 2, 3, 14 и 22 дня у крыс). На каждый временной интервал приходилось от 5 до 10 животных.

Миокард левого желудочка зажимали охлажденными щипцами Волленбергера и растирали в жидком азоте. Навески замороженного в жидком азоте порошка ткани миокарда (200—300 мг) тщательно регомогенизировали в 4 мл метаполводной смеси (2/1 об/об), к которой были добавлены [ $H^3$ ] РГ ( $A_2$ ,  $E_1$  и  $F_{2\alpha}$ ) по 1000 имп/мин каждого для подсчета конечного исхода РГ в про-

цессе экстракции и хроматографии на кремниевой кислоте. Гомогенаты подкисляли муравьиной кислотой до pH 3,5 и дальнейшие этапы экстракции PG хлороформом проводили по методу, предложенному Auletta и соавт. [27].

Разделение суммарного экстракта PG на PGA, PGE и PGF<sub>2α</sub> осуществляли, хроматографируя образцы проб на стеклянных микроколошках диаметром 0,5 см, заполненных 0,5 г кремниевой кислоты («Bio-Sil» A, «Bio-Rad Laboratory», 100—200 меш). Выпаренные фракции PG растворяли в метаноле, часть их брали для подсчета радиоактивности на сцинтилляционном счетчике Mark III и рассчитывали процент выхода PG из ткани по первоначально добавленной стандартной метке. Другую часть фракции оставляли для проведения радиоиммуноанализа.

Радиоиммунологическое определение PG и их количественный подсчет проводили по методике и на реагентах, предложенных фирмой «Clinical Assay Inc». (США). Мы изменили лишь процедуру перевода PGE и PGA в PGB, используя 0,02N раствор NaOH, что значительно облегчает процесс радиоиммуноанализа [28]. Остальные процедуры анализа PG проводили по схеме, предложенной фирмой, за исключением конечного этапа. Образовавшийся белковый комплекс растворяли в 500 мкл солиобилизатора NCS («Nuclear Chicago») и просчитывали радиоактивность в 5 мл толуольного сцинтиллятора [29]. Циклические нуклеотиды в ткани сердца также определяли при помощи наборов реагентов («Kit») и по инструкции фирмы «Amersham» (Англия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Динамика содержания простагландинов в миокарде при острой перегрузке давлением и их возможная связь с функцией сердца

Анализ физиологических показателей в течение всего времени наблюдения выявил два типа гемодинамических реакций среди случайно выбранной группы кроликов при создании относительно однополовой перегрузки сердца давлением. Мы обнаружили, что приблизительно 50% животных адаптировались к навязанной перегрузке. У этой группы животных ЛЖСД, резко возросшее в ответ на коарктацию, оставалось практически неизменным в процессе всего опыта. Показатели сократимости для адаптированной группы животных представлены на верхней кривой рис. 88. У II группы животных (50%) мы наблюдали падение ЛЖСД через 15 мин от начала стеноза аорты. Это снижение составило более чем 30% от исходных цифр ЛЖСД. Показатели индекса сократимости этой группы животных продемонстрированы на нижней кривой рисунка. Мы назвали эту группу животных слабоадаптирующейся. У большинства животных этой группы в ответ на острую перегрузку давлением развивалась сердечная недоста-

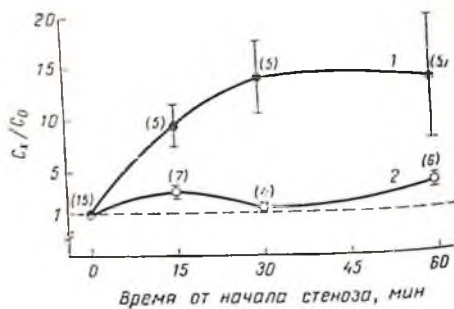
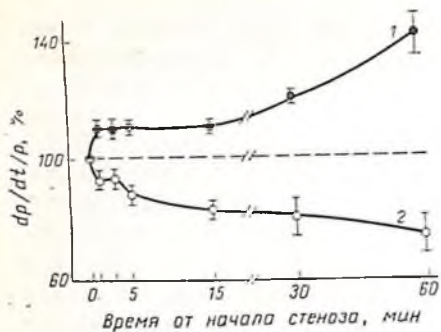


Рис. 88. Индекс сократимости в различные интервалы времени после стеноза в процентах от контрольных величин.

1 — адаптирующиеся к перегрузке кролики; 2 — слабо адаптирующиеся к перегрузке кролики.

Рис. 89. Изменение содержания РГЕ в левом желудочке сердца кроликов в различные сроки после стеноза восходящей дуги аорты в относительных величинах.

1 — адаптирующиеся к перегрузке кролики; 2 — слабо адаптирующиеся к перегрузке кролики.

точность, если наблюдение продолжалось несколько часов. В течение первых 5 мин эксперимента у 60—70% слабоадаптирующихся животных отмечались различные типы транзиторных аритмий.

Изменения гемодинамических показателей в первые минуты после коарктации аорты свидетельствуют о том, что «включены» резервные возможности миокарда, направленные на поддержание системной гемодинамики. Наши результаты показывают, что компенсаторные возможности у разных животных неодинаковы.

Можно полагать, что повышение ЛЖСД у животных, адаптирующихся к нагрузке, обеспечивается включением двух механизмов авторегуляции: механизмом Франка — Старлинга и повышенным инотропным состоянием миокарда. У животных II группы ЛЖСД достигается только за счет первого механизма, т. е. значительного переполнения сердца (о чем свидетельствует высокое конечное диастолическое давление в полости левого желудочка) и не подкрепляется увеличением сократимости миокарда (индекс сократимости снижается). Такой способ обеспечения высокого ЛЖСД является, вероятно, менее адаптивным.

У животных I группы при нагрузке под давлением возрастает скорость сокращения и расслабления левого желудочка, в то время как у животных II группы эти показатели снижаются.

На рис. 89 и 90 приведено тканевое содержание РГ, определенное в быстро замороженных образцах содержания РГ, определенное у адаптированных и слабоадаптированных групп животных. На оси ординат представлено отношение тканевого содержания РГ у подопытных животных к такому же показателю у «ложнооперированных» в различные временные интервалы. Каждая точка соответствовала в среднем 5 животным.

Рис. 90. Изменение содержания PGE в левом желудочке сердца кроликов в разные сроки после стеноза восходящей дуги аорты в относительных величинах.

1 — адаптирующиеся к перегрузке кролики; 2 — слабо адаптирующиеся к перегрузке кролики.



Рис. 89 отражает изменения в содержании PGE в левом желудочке сердца адаптированных кроликов в разное время от начала коарктации аорты. Как видно из этого рисунка, содержание PGE у этой группы животных увеличивается в 5—10 раз в результате коарктации аорты. В то же время, у слабоадаптирующихся к перегрузке животных содержание PGE в ткани миокарда незначительно превышает контрольный уровень. Эти результаты показывают, что подъем ЛЖСД и показателей индекса сократимости у адаптирующихся животных сопровождается одновременным увеличением содержания PGE в левом желудочке сердца. С другой стороны, неспособность сердца поддерживать высокое ЛЖСД при перегрузке давлением в группе слабоадаптированных животных сопровождается и неспособностью увеличивать эндогенный уровень PGE в левом желудочке.

Существенно, что подобные результаты были получены и с другим типом PG, а именно  $PGF_{2\alpha}$  (см. рис. 90). На оси ординат показано отношение содержания  $PGF_{2\alpha}$  в миокарде левого желудочка подопытных животных к содержанию его у «ложнооперированных», а на оси абсцисс — временные интервалы от начала коарктации. И снова в группе животных, адаптированных к острой перегрузке давлением, наблюдается подъем тканевого содержания  $PGF_{2\alpha}$ . Как и в случае с PGE, содержание  $PGF_{2\alpha}$  в левом желудочке слабоадаптирующихся животных мало отличается от уровня его у «ложнооперированных».

Значительный подъем в содержании эндогенных PG в левом желудочке адаптированных животных после коарктации аорты и отсутствие такой реакции у слабоадаптированных животных позволяют предположить, что синтез PG может играть важную роль в физиологической реакции сердца на перегрузку.

### **Влияние внутрижелудочковой инфузии индометацина на содержание простагландинов, ферментных систем миокарда и функцию сердца при острой перегрузке давлением**

Если верно наше предположение, то ингибирование синтеза PG в сердцах адаптированных после коарктации животных должно изменить гемодинамические показатели в этой группе живот-

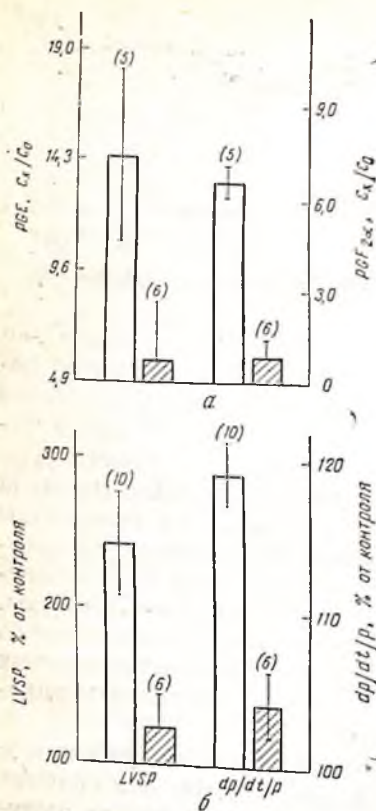


Рис. 91. Изменение содержания PG и гемодинамических показателей работы сердца при введении индометацина в относительных величинах.

а — содержание PGE<sub>2</sub> в ткани сердца животных: светлый столбик — контрольных; заштрихованный — опытных; содержание PGF<sub>2α</sub> светлый столбик — контрольных и заштрихованный — опытных; б — систолическое давление в левом желудочке сердца животных (светлый столбик — контрольных, заштрихованный — опытных). Индекс сократимости левого желудочка сердца животных (светлый столбик — контрольных, заштрихованный — опытных). Цифры в скобках — число опытов.

ных, делая их менее адаптированными при той же степени нагрузки. Для проверки этой гипотезы мы применили индометацин, хорошо известный ингибитор синтеза PG, который вводили в полость левого желудочка адаптированным животным через 15 мин после коарктации аорты. В течение всего периода наблюдения проводили непрерывную регистрацию гемодинамических показателей сердца. Через 15 мин левый желудочек сердца извлекали для определения тканевого содержания PG. Контролем в этих экспериментах служили животные, которым вводили в полость левого желудочка тот же раствор, но без индометацина.

Как видно из рис. 91,а, внутрижелудочковая инфузия индометацина значительно ингибирует синтез PGE<sub>2</sub> и PGF<sub>2α</sub> в миокарде левого желудочка кроликов, подвергнутого острой перегрузке сердца давлением. Так, синтез PGE<sub>2</sub> тормозится (блокирован) на 60%, а PGF<sub>2α</sub> на 80%. Влияние инфузии индометацина на гемодинамические показатели сердца (ЛЖСД и индекс сократимости) представлено на рис. 91,б (внизу). Из этого рисунка видно, что при 15-минутном введении индометацина ЛЖСД снижается на 60% относительно контрольных животных. Наблюдается значительное статистически достоверное снижение (на 20%) показателей индекса сократимости у животных, получивших индометацин. Таким образом, из этих опытов следует, что блокада синтеза PG в сердцах адаптирующих к перегрузке животных приводит к изменению гемодинамических показателей сердца, характерных для II группы животных, т. е. слабоадаптированных. При этой же постановке опыта в ткани сердца были исследованы гистохимически активности некоторых ферментов цикла Кребса (сукцинат-, малат- и глутаматдегидрогеназа), жирового (β-оксипиратдегидрогеназа) и углеводного (лактатдегидрогена-

за, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа и фосфоорилаза) обмена, а также одного из основных ферментов, разрушающих PG (15-простагландиндегидрогеназа). Нужно подчеркнуть, что эти ферменты играют не последнюю роль в метаболических процессах в сердечной мышце, обуславливая ее нормальное функционирование.

При исследовании данного спектра ферментов нам не удалось обнаружить статистически достоверных различий в изменении их активности в опытной и контрольной группах животных при 15-минутной инфузии индометацина в полость левого желудочка. Однако в литературе имеются данные о том, что более длительное (свыше 30 мин) или многодневное введение небольших доз индометацина может приводить к снижению активности некоторых ферментов в органах и тканях [30].

Анализ полученных результатов приводит к следующим выводам: 1. Кратковременная инфузия индометацина (не более 15 мин), по-видимому, не влияет на активность большинства ферментов в сердце (кроме PG-синтазы).

2. В данной постановке опыта индометацина сам по себе не приводит к изменению метаболизма в сердце, которое могло бы послужить причиной снижения сократительной активности миокарда.

3. Результаты этих исследований являются одним из доказательств нашего предположения о том, что снижение синтеза PG в сердце может привести к изменению его сократительной активности и стать одной из причин срыва адаптационных механизмов при перегрузке давлением.

### **Содержание простагландинов и циклических нуклеотидов в сердце при хронической перегрузке давлением**

Коарктация брюшной аорты у крыс вызвала четкое и статистически достоверное увеличение массы сердца (рис. 92). По скорости развития и степени гипертрофии сердца животные были подразделены на три группы. I группа — выраженная гипертрофия (быстро адаптирующийся тип). Крысы этого типа отличались от других животных более активным поведением и отсутствием видимых признаков сердечной недостаточности. II группа — умеренно выраженная гипертрофия (медленно адаптирующийся тип). Животные малоактивные, с заметными признаками сердечной недостаточности (одышка, асцит). III группа — слабая степень гипертрофии миокарда и быстро развивающаяся декомпенсация сердца. Все три группы животных отличались друг от друга разной степенью изменения содержания PG в миокарде в ответ на острую и хроническую перегрузку сердца давлением. На рис. 93 показана динамика содержания PGE и PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  соответственно.

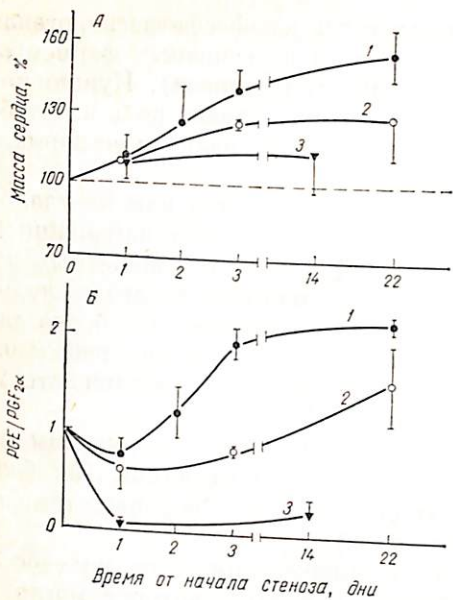


Рис. 92. Изменение относительной массы сердца (а) и отношение содержания PGE/PGE<sub>2α</sub> в ткани сердца крыс в разные сроки от начала стеноза брюшного отдела аорты в процентах и относительных величинах от контрольных значений.

А: 1 — адаптирующиеся к перегрузке животные; 2 — слабо адаптирующиеся; 3 — неадаптирующиеся; Б: 1 — отношение содержания PGE/PGE<sub>2α</sub> в ткани сердца адаптирующихся к перегрузке животных; 2 — в ткани сердца слабо адаптирующихся; 3 — в ткани сердца неадаптирующихся животных.

Первый тип животных с наиболее высокой скоростью развития гипертрофии, а следовательно, и адаптации сердца к навязанной перегрузке характеризуется высоким содержанием PG в сердце (см. рис. 93). Эти данные хорошо согласуются с описанными выше результатами. Хорошо известно, что в основе такой гипертрофии лежит стимуляция синтеза нуклеиновых кислот и белка, синтез которого наблюдается уже в ранние сроки после создания перегрузки на сердце. Lomas и соавт. [21], исходя из своих экспериментальных данных, предположили, что должна существовать связь между активностью PG-синтетазы в сердце и синтезом белка. Они обнаружили прямую корреляцию между содержанием PG в сердце крысы после 5-минутной коарктации восходящей дуги и активностью аденилатциклазы. Эти исследователи впервые выдвинули предположение, что одним из первоначальных стимулов, запускающих цепь биохимических реакций, ведущих к белковому синтезу, является ранняя активация PG-синтетазы. Однако эта активация синтеза PG может начинаться при различных воздействиях, в первую очередь нервных и гормональных. Конечный результат этих воздействий — быстрый синтез в миокарде обеих групп PG (E и F<sub>2α</sub>). Рост содержания PG был обнаружен у животных I типа.

В литературе существуют данные о различном влиянии PGE и PGF<sub>2α</sub> на синтез нуклеиновых кислот и белка: для PGE показано стимулирующее, а для PGF<sub>2α</sub> — блокирующее влияние [31, 32]. Исходя из этого мы предположили, что развитие гипертрофии, возможно, связано с изменением отношения уровней PGE/PGF<sub>2α</sub> в сердце. Сопоставление динамики этого показателя

с динамикой относительного увеличения массы сердца свидетельствует об определенной взаимосвязи этих двух величин (см. рис. 91). Так, наиболее выраженное увеличение отношения  $PGE/PGF_{2\alpha}$  в сторону роста  $PGE$  совпадает по времени с интенсивным увеличением массы сердца.

Остается неясным главный вопрос: каким образом  $PG$  влияют на синтез белка. Наиболее вероятно, что это происходит путем влияния  $PGE$  на систему цАМФ [35]. Kuehl [33] на основании своих экспериментов выдвинул гипотезу, что  $PGE$  и  $PGF_{2\alpha}$  действуют на метаболизм клеток через различные медиаторы (цАМФ и цГМФ) соответственно. Так как одна из задач нашего исследования состояла в том, чтобы обнаружить возможную связь  $PG$  с циклическими нуклеотидами в процессе адаптации сердца к острой и хронической перегрузке давлением, то в дальнейшем характер этой связи будет рассматриваться только для животных I типа, у которых эти признаки выражены в большей степени, чем у остальных (II и III группы).

На рис. 94 показана связь между содержанием цАМФ и  $PGE$ , цГМФ и  $PGF_{2\alpha}$ . Анализ этих данных показал, что динамика содержания  $PGE$  в сердце крыс совпадает с динамикой содержания цАМФ. Это еще раз подтверждает гипотезу Kuehl [33] о том, что  $PGE$  осуществляют свое воздействие через цАМФ. Обратный характер зависимости был выявлен для  $PGF_{2\alpha}$  и цГМФ в процессе адаптации сердца к перегрузке давлением. В настоящий момент трудно объяснить этот парадоксальный, на первый взгляд, характер связи между цГМФ и  $PGF_{2\alpha}$ . Дальнейшие опыты помогут внести ясность в этот сложный вопрос. При сравнении изменений содержания цАМФ и цГМФ можно заметить, что эти показатели ведут себя «зеркально» в отношении один другого, что подтверждает гипотезу Goldberg о взаимно противоположной роли цАМФ и цГМФ в регуляции метаболических процессов в клетке [34, 35].

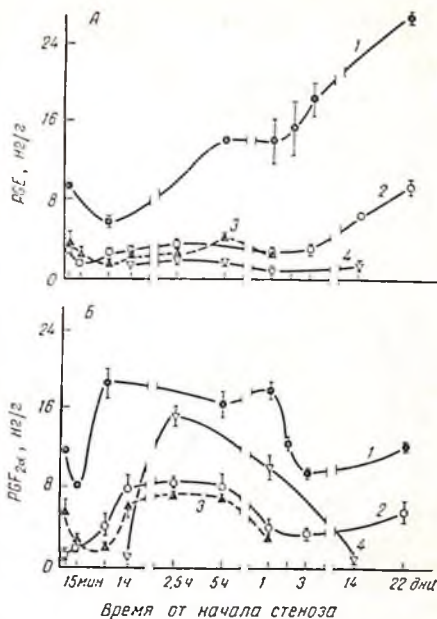


Рис. 93. Содержание  $PGE$  (А) и  $PGF_{2\alpha}$  (Б) в левых желудочках сердца крыс в разные сроки от начала стеноза аорты в  $ng/g$  ткани сердца.

1 — адаптирующиеся к перегрузке животные; 2 — слабо адаптирующиеся; 3 — неадаптирующиеся животные; 4 — «ложнопереперированные» животные (контроль).



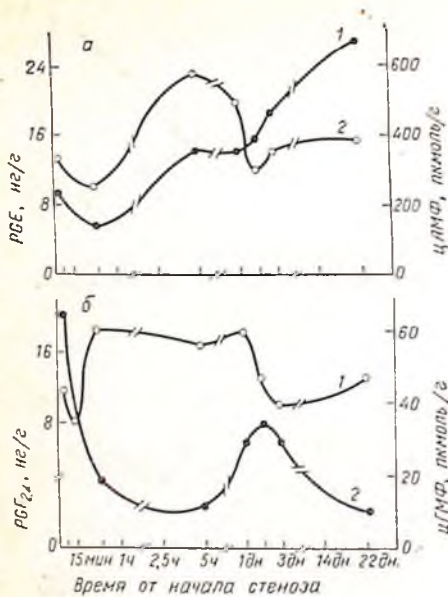


Рис. 94. Связь между содержанием PGE и цАМФ (а) и PGE<sup>α</sup> (б) и цГМФ в ткани левого желудочка сердца адаптированных животных. а: 1 — PGE; 2 — цАМФ; б: 1 — PGE<sup>α</sup>; 2 — цГМФ.

### Возможная роль простагландинов в адаптации сердца к перегрузке давлением

Анализ данных литературы и результатов наших экспериментов позволяет сформулировать следующую гипотезу о участии PGE в механизме адаптации сердца к данным воздействиям. Суть гипотезы изображена на рис. 95.

Рассмотрим возможные механизмы влияния PGE на сократительную способность сердца. Известно, что PGE (в сердце E<sub>2</sub>) активируют фермент аденилатциклазу практически во всех изученных органах и тканях, в том числе и в сердце. Limas и соавт. в опытах на модели острой перегрузки сердца давлением у крыс показали, что PGE-зависимая аденилатциклаза активируется уже через 5 мин после нагрузки и что эта стимуляция блокируется индометацином.

Из нашей схемы следует, что PGE активируют аденилатциклазу сердца, причем сейчас показано, что эта активация не зависит от действия катехоламинов (эффект осуществляется и при блокаде пропранололом), запуская весь каскад биохимических реакций, имеющих непосредственное отношение к процессам транспорта Ca<sup>2+</sup> в миокарде [36]. В настоящее время имеются наблюдения, сделанные в системе *in vitro* [37], показывающие стимуляцию

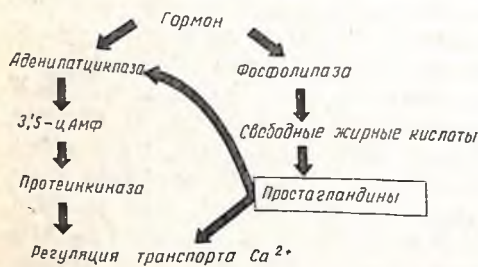


Рис. 95. Предполагаемый механизм действия простагландинов при адаптации сердца к перегрузке давлением.

активности цАМФ-зависимой протеинкиназы и фосфоорилазы сердца крысы PGE независимо от воздействия катехоламинов. Эти факты и ряд других, описанных ранее, приводят к выводу, что PGE, по-видимому, влияют на все этапы регуляции транспорта Ca<sup>2+</sup> в сердце. Нижняя стрелка на схеме — еще одна предполагаемая возможность воздействия PGE на транспорт

Ca<sup>2+</sup> как ионофор [38]. Последняя точка зрения имеет меньше доказательств и, на наш взгляд, не очень вероятна.

Таким образом, в регуляции метаболических процессов, обуславливающих сократительную активность миокарда, P<sub>G</sub>, вероятно, служат промежуточным звеном между физиологически активными веществами (катехоламинами и др.) и внутриклеточной регуляторной системой (аденилатциклаза-цАМФ).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hollenberg M., Walker R. S., McCormick D. P.* Cardiovascular responses to intracoronary infusion of prostaglandins E<sub>1</sub>, F<sub>1α</sub> and F<sub>2α</sub> (1).—Arch. int. Pharmacodyn, 1968, 174, 66—73.
2. *Nakano J.* Effects of prostaglandins E<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, and F<sub>2α</sub> on the coronary and peripheral circulations.—Proc. Soc. exp. Biol., (N. Y.), 1968, 127, 1160—1163.
3. *Needleman P.* The synthesis and function of prostaglandins in the heart.—Fed. Proc., 1976, 35, 2376—2381.
4. *Kalsner S.* Endogenous prostaglandin release contributes directly to coronary artery tone.—Can. J. Physiol. Pharmacol., 1975, 53, 560—565.
5. *Zayat A. F., Hefnawi F., Amir Y. E., Bayoomi W. K.* Histophysiological studies of prostaglandin F<sub>2α</sub> on isolated organs. I. Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> on the heart.—Prostaglandins, 1977, 13, 131—142.
6. *Förster W., Mentz P.* Effects of prostaglandin E-1, prostaglandin E-2 and prostaglandin F-2-alpha on isolated normal and damaged heart preparations.—Adv. Biosci., 1973, 9, 379—384.
7. *Schrör K., Förster W.* Interactions between isoproterenol and prostaglandin E<sub>2</sub> in the dog heart in situ.—Pol. J. Pharmacol. Pharm., 1974, 26, 143—149.
8. *Su J. Y., Higgins C. B., Friedman W. F.* Chronotropic and inotropic effects of prostaglandins E<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> and F<sub>2α</sub> on isolated mammalian cardiac tissue.—Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1973, 143, 1227—1230.
9. *Kaumann A. J., Birnbaumer L.* Prostaglandin E<sub>1</sub> action on sinus pacemaker and adenylyl cyclase in kitten myocardium.—Nature, 1974, 251, 515—517.
10. *Moura A. M., Simpkins H.* Cyclic AMP levels in cultured myocardial cells under the influence of chronotropic and inotropic agents.—J. Mol. cell. Cardiol., 1975, 7, 71—77.
11. *Sobel B. E., Robison A. K.* Activation of guinea pig myocardial adenylecyclase by prostaglandins (abstr).—Circulation, 1969, 40 (Suppl. III), 111—189.
12. *Levy G. S., Klein I.* Solubilized myocardial adenylate cyclase: Activation by prostaglandins.—Life Sci., 1973, 13, 41—46.
13. *Levey G. S.* Phospholipids, adenylate cyclase, and the heart.—J. Mol. cell. Cardiol., 1972, 4, 283—285.
14. *Piper P., Vane J.* The release of prostaglandins from lung and other tissues.—Ann. N. Y. Acad. Sci., 1971, 180, 363—385.
15. *Schreiber S. S., Klein I. L., Oratz M., Rothschild M. A.* Effect of acute overload on protein synthesis in cardiac muscle microsomes.—Am. J. Physiol., 1967, 213, 1552—1555.
16. *Gudbjarnason S.* Prostaglandins and polyunsaturated fatty acids in heart muscle (editorial).—J. Mol. cell. Cardiol., 1975, 7, 443—449.
17. *Wennmalm A.* Studies on mechanisms controlling the secretion of neurotransmitters in the rabbit heart.—Acta physiol. scand. (Suppl.), 1971, 365, 1—36.
18. *Bloek A. J., Poole S., Vane J. R.* Modification of basal release of prostaglandins from rabbit isolated hearts.—Prostaglandins, 1974, 7, 473—486.

19. Wennmalm A., Pham-Huu-Chanh, Junstad S. Hypoxia causes prostaglandin release from pertused rabbit hearts.—Acta Physiol. scand., 1974, 91, 133—135.
  20. Needleman P., Key S. L., Isakson P. C., Kulkarni P. S. Relationship between oxygen tension, coronary vasodilation and prostaglandin biosynthesis in the isolated rabbit heart.—Prostaglandins, 1975, 9, 123—134.
  21. Limas C. J., Ragan D., Freis E. D. Effect of acute cardiac overload on intramycardial cyclic 3',5'-AMP: Relation to prostaglandin synthesis.—Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1974, 147, 103—105.
  22. Mest H. J., Blass K. E., Förster W. On the antiarrhythmic action of prostaglandins A<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>α and F<sub>2</sub>α on the strophanthin arrhythmia model of the cat (Ger).—Acta biol. Med. Ger., 1976, 35, 63—67.
  23. Förster W. Prostaglandins and prostaglandin precursors as endogenous antiarrhythmic principles of the heart.—Acta biol. Med. Ger., 1976, 35, 1101—1112.
  24. Mann D., Meyer H. G., Förster W. Preliminary clinical experience with the antiarrhythmic effect of PGF<sub>2</sub>α.—Prostaglandins, 1973, 3, 905—912.
  25. Vergoesen A. J., De Boer J. The effects of prostaglandins on the hypodynamic frog heart compared with those of fatty acids, epinephrine and adenosine phosphates.—J. Am. Oil. Chem. Soc., 1971, 48, 94A.
  26. Wollenberger A., Ristau O., Schoffa G. A simple technic for extremely rapid freezing of large pieces of tissue. (Ger).—Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1960, 270, 399—412.
  27. Auletta F. J., Zusman R. M., Caldwell B. V. Development and standardization of radioimmunoassays for prostaglandins E, F, and A.—Clin. Chem., 1974, 20, 1580—1587.
  28. Andersen N. H. Dehydration of prostaglandins: study by spectroscopic method.—J. Lipid. Res., 1969, 10, 320—325.
  29. Florini J. R., Dankberg F. L. Changes in ribonucleic acid and protein synthesis during induced cardiac hypertrophy.—Biochemistry, 1971, 10, 530—535.
  30. Roman R. J., Kauker M. L., Terragno N. A., Wong P. Y. K. Inhibition of renal prostaglandin synthesis and metabolism by indomethacin in rats.—Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1978, 159, 165—170.
  31. Lupulescu A. Effect of prostaglandins on protein, RNA, DNA and collagen synthesis in experimental wounds.—Prostaglandins, 1975, 10, 573—579.
  32. Ragni M. V., Preuss H. C. PGE<sub>1</sub> stimulation of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into renal slice DNA.—Clin. Res., 1971, 49, 545.
  - \*33. Kuehl F. A. Prostaglandin cyclic nucleotide interaction in mammalian tissues.
- In: Prostaglandins: Chemical and Biochemical aspects /Ed. S. M. M. Karim.—Lancaster: MTR press Limited, 1976, p. 192—225.
34. Goldberg N. D., Haddox M. K., Nicol S. E. et al. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: The Yin Yang hypothesis.—In: Adv. Cyclic Nucleotide Res /Eds. G. I. Drummond, P. Greengard, G. A. Robinson.—New York: Raven Press, 1975, v. 5, p. 307—351.
  35. Johnson M., Ramwell P. W. Prostaglandin interaction with membrane components. Intra Sci. Chem. Rept., 1974, 88, 93—104.
  36. Silver M. J., Smith J. B. Prostaglandins as intracellular messengers.—Life Sci., 1975, 16, 1635—1648.
  37. Keely S. L., Park C. R. Effects of epinephrine and PGE<sub>1</sub> on heart cAMP dependent protein kinase, phosphorylase, and contraction (abstr).—Fed. Proc., 1977, 36, 283.
  38. Carsten M. E., Miller J. Effects of prostaglandins and oxytocin on calcium release from a uterine microsomal fraction.—J. biol. Chem., 1977, 252(5), 1576—1581.

## ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ В ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА СЕРДЦА

Ю. М. СЕЛЕЗНЕВ, С. М. ДАНИЛОВ, Н. Г. ВОЛКОВА,  
Г. В. КОЛПАКОВА, А. В. МАРТЫНОВ (СССР)

На основании исследований взаимодействия глюкокортикоидов с цитоплазматической и ядерной фракциями сердечной ткани была выдвинута концепция, что сердце является органом-мишенью для глюкокортикоидных гормонов [1—4]. В настоящей работе суммируются результаты, подтверждающие эту работу.

В сердце обнаружены три глюкокортикоидсвязывающие фракции (комплексообразователи I, II и III). Некоторые из свойств комплексообразователей I и II были представлены на предыдущем советско-американском симпозиуме [4]. По совокупности свойств комплексообразователь I аналогичен кортикостероидсвязывающему глобулину сыворотки — транскортину. Попытки выяснить локализацию этой фракции в сердечной ткани показали, что по крайней мере большая часть ее представляет собой межклеточный пул транскортина, который попадает в цитоплазматическую фракцию при гомогенизации ткани. Присутствие транскортина в межклеточном пространстве перфузированных изолированных сердец снижало внутриклеточную аккумуляцию естественно встречающихся глюкокортикоидов, но не синтетического глюкокортикоида дексаметазона, который неспособен образовывать комплекс с транскортином. Второй глюкокортикоидсвязывающий белок, обнаруженный в препаратах цитозоля, — комплексообразователь II — в отличие от транскортина способен с высоким средотвием связывать дексаметазон и степень его средства к другим стероидам коррелирует с их глюкокортикоидной активностью. Этот белок локализован внутри клеток.

Комплексообразователь III — еще один глюкокортикоидсвязывающий белок, обнаруженный нами недавно в препаратах цитозоля сердца крысы [3]. Эта фракция выявляется в препаратах цитозоля только после тщательного отмывания сердец от экстраклеточного транскортина вследствие значительно меньшей ее концентрации в обычных препаратах цитозоля по сравнению с загрязнениями транскортином. Комплексообразователь III, подобно транскортину, образует комплексы с естественно встречающимися глюкокортикоидами и не связывает дексаметазон, но обработка SH-блокатором вызывает его инактивацию.

В табл. 27 приведены физические параметры связывающих белков, вычисленные по результатам гель-хроматографии и седиментационного анализа <sup>3</sup>H-глюкокортикоид-белковых комплексов цитозоля миокарда крысы. Молекулярная масса указана с учетом отклонения формы макромолекул от глобулярной. Как видно из

ТАБЛИЦА 27

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАТЕЛЕЙ

Свойства	Комплексообразователь		
	I	II	III
Радиус Стокса, низкая ионная сила	3,65	5,30	3,15
высокая » »	3,65	3,95	3,15
Коэффициент седиментации, S: низкая ионная сила	4,0	7,0	4,0
высокая » »	4,0	4,0	4,0
Фрикционное отношение: низкая ионная сила	1,24	1,32	1,13
высокая » »	1,24	1,31	1,13
Молекулярная масса низкая ионная сила	63 500	161 400	54 800
высокая » »	63 500	68 700	54 800

Радиусы Стокса вычисляли по [5] на основании результатов гель-хроматографии <sup>3</sup>H-глюкокортиконд-цитозольных комплексов на ультрагеле АСА-34, коэффициенты седиментации — по [6] на основании результатов ультрацентрифугирования комплексов в градиенте плотности сахарозы [7], фрикционное отношение и молекулярные массы по [8].

этой таблицы, комплексообразователи I, II и III отличаются по размерам.

В условиях бесклеточной системы, особенно в отсутствие глюкокортикоидов, комплексообразователь II чрезвычайно лабилен. Его связывающая активность утрачивается в случае продолжительного хранения при 0—4° С, кратковременном выдерживании выше 25—30° С, повышении ионной силы растворов. Образование комплекса с глюкокортикоидом повышает его стабильность. Тем не менее в буферной системе, содержащей относительно невысокую концентрацию протектора сульфгидрильных групп — дитиотрейтола (буфер 1, рис. 96), при 0—4° С в присутствии гормона за 18—24 ч происходит заметная инактивация комплексообразователя II. Равновесие в системе свободный стероидсвязанный стероид наступает приблизительно через 18 ч инкубации. В это время значения константы ассоциации ( $K_{асс}$ ) достигают наибольшей и постоянной величины, тогда как самое высокое значение концентрации связывающих мест (N) отмечено к 4-му часу инкубации. Применение буферной системы, содержащей повышенную концентрацию дитиотрейтола (буфер 2, рис. 97), существенно снижало скорость инактивации комплексообразователя II даже

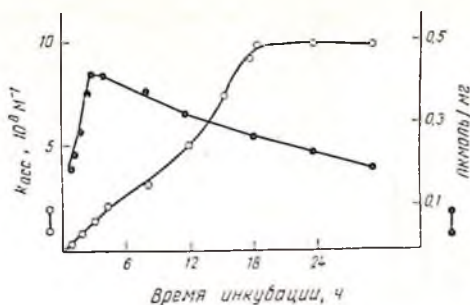


Рис. 96. Специфическое связывание  $^3H$ -дексаметазона комплексообразователем II цитозоля сердца адреналэктомированных крыс в зависимости от продолжительности инкубации при  $4^{\circ}C$ . Концентрация белка в цитозоле —  $5,5$  мг/мл, метод выделения цитозоля и определения связывания подробно описан в [2]. Для выделения цитозоля использован буфер 1: трис —  $25$  мМ, KCl —  $12,5$  мМ, сахараза —  $0,25$  М, ЭДТА —  $0,5$  мМ, дитиотрейтол —  $1,5$  мМ (рН  $7,5$ ). Каждая точка на графике — среднее арифметическое трех параллельных определений. Репрезентативные результаты одного из двух отдельных экспериментов.

в отсутствие глюкокортикоида (рис. 97). Приведенные данные позволяют считать наиболее корректным значение константы ассоциации комплексообразователя II с дексаметазоном величиной  $10^9 M^{-1}$ , а не  $10^8 M^{-1}$ , как сообщалось ранее [1, 2]. В аналогичных условиях равновесие в системе свободный кортикостерон — кортикостерон, связанный транскортином наступает за несколько минут и связывание не зависит от присутствия протекторов или блокаторов сульфгидрильных групп [2].

Ниже будут приведены результаты опытов в бесклеточной системе, которые позволяют приблизиться к пониманию роли глюкокортикоидсвязывающих белков в передаче глюкокортикоидного сигнала в клеточные ядра в сердце. Комплексообразователь II при определенных условиях способен резко увеличивать аккумуляцию  $^3H$ -глюкокортикоидов в ядрах. При  $0-4^{\circ}C$  комплексы глюкокортикоидов с этим связывающим белком находятся в «преактивном» состоянии. Активация комплексов кратковременным прогреванием при  $20^{\circ}C$  вызывает значительное повышение аккумуляции гормонов ядерной фракцией [2]. При физиологических концентрациях гормонов (около  $10^{-8} M$ ) в аналогичных условиях другие связывающие белки цитозоля не обладают таким свойством. Более того, свободная форма гормонов практически не поглощается ядрами. Как показано на рис. 98, факторами активации комплекса глюкокортикоидов с комплексообразователем II могут быть также обработка цитозоля  $0,4$  KCl или  $10$  мМ теофиллином. Такие же закономерности характерны для переноса глюкокортикоидов в ядра печеночным цитоплазматическим рецептором для глюкокортикоидных гормонов [8]. Таким образом, комплексообразователь II, очевидно, является цитоплазматическим рецептором глюкокортикоидов в клетках сердечной ткани. На

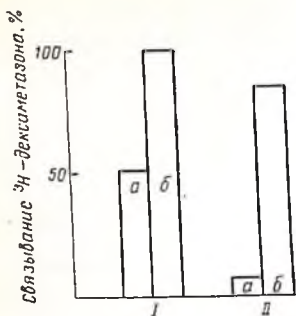


Рис. 97. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -дексаметазона цитозолем сердца адреналэктомированных крыс в различных буферных системах. Связывание оценивали 4-часовой инкубацией дексаметазона с цитозолем. I — оценку связывания проводили сразу же после выделения цитозоля; II — оценку связывания проводили после 16 ч хранения цитозоля при  $4^\circ\text{C}$  в отсутствие стероида.

а — цитозоль выделили в буфере I; б — в буфере II. Состав буфера II: трис — 50 мМ, KCl — 50 мМ, сахароза — 0,25 М, ЭДТА — 1,5 мМ, дитиотрейтол — 10 мМ (рН 7,5). Столбики на рисунке представляют величины средних арифметических параллельных определений. Репрезентативные результаты одного из двух отдельных экспериментов.

рис. 99 приведены данные экспериментов, в которых исследовали аккумуляцию  $^3\text{H}$ -дексаметазон-рецепторного комплекса сердца ядрами, выделенными из печени, и, наоборот,  $^3\text{H}$ -дексаметазон-рецепторного комплекса печени ядрами сердечной ткани. Эти опыты демонстрируют, что оба типа стероид-рецепторных комплексов способны аккумуляроваться ядрами как из печени, так и из сердца. К сожалению, в этих экспериментах концентрация стероид-рецепторного комплекса печени была значительно выше, чем сердечного комплекса, поэтому правильнее давать только качественную оценку процессов аккумуляции комплексов различными ядерными фракциями. Однако, поскольку ядерная аккумуляция повышалась с увеличением концентрации одного и того же стероид-рецепторного комплекса в системе (см. две нижние кривые на рис. 99), то можно предположить, что этот процесс определяется в большей степени количеством комплекса в системе, чем тканевой (клеточной) специфичностью. Общее количество ядерных акцепторов в каждой из систем было значительно выше количества комплекса, необходимого для насыщения ядер.

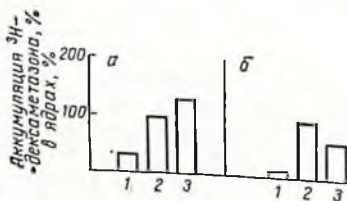
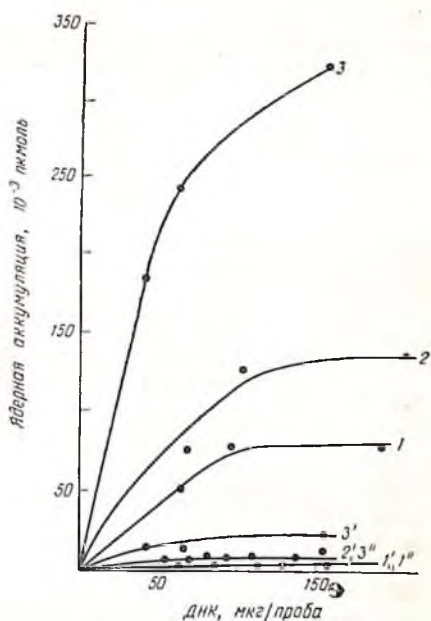


Рис. 98. Аккумуляция  $^3\text{H}$ -дексаметазона в ядрах после активации  $^3\text{H}$ -дексаметазон-цитозольных комплексов различными факторами. Выделение  $^3\text{H}$ -ной аккумуляции проводили как описано ранее [2]. Во всех экспериментах в течение 20 мин при  $4^\circ\text{C}$ .

а: 1 — неактивированный комплекс; 2 — комплекс, активированный нагреванием 20 мин при  $20^\circ\text{C}$ ; 3 — комплекс, активированный 10 мМ теофиллином; б: в этих зон-цитозольного комплекса белка в 2 раза выше обычной [2]. Перед инкубацией с ядрами  $^3\text{H}$ -дексаметазон-цитозольные комплексы разбавляли в 4 раза буферным раствором и добавляли кристаллический KCl до конечной концентрации 0,1 М. 1 — неактивированный комплекс; 2 — комплекс, активированный нагреванием 20 мин при  $20^\circ\text{C}$ ; 3 — комплекс, активированный 0,4 М KCl перед разбавлением.

Рис. 99. Аккумуляция  $^3\text{H}$ -дексаметазон-цитозольных комплексов ядерными фракциями, выделенными из сердца и печени. 1,1', 2,2' — цитозол из сердца, ядра из печени; 3,3' — цитозол — из печени, ядра из сердца. 1'',2'',3'' — буферный раствор, содержащий свободный  $^3\text{H}$ -дексаметазон, ядра из соответствующей ткани. 1,1'',2'',2'',3,3'' — инкубация при 20 °С в течение 20 мин, 1',2',3' — инкубация при 0 °С в течение 20 мин. Концентрация  $^3\text{H}$ -дексаметазон-цитозольных комплексов, нкмоль/мг белка. 1 — 0,24, 2 — 0,33, 3 — 0,86. Концентрация белка в цитозоле — 10–12 мг/мл.



В бесклеточной системе ядерная аккумуляция естественно встречающегося глюкокортикоида — кортикостерона зависит от соотношения связывающих белков, присутствующих в препаратах [10]. Увеличение доли кортикостерона, связанного не транскортином, а цитоплазматическими белками (комплексобразователи II и III), повышает поглощение гормона ядрами. Это указывает, что транскортин ограничивает в данных условиях доступность гормона или циторецептора. В то же время величина аккумуляции кортикостерона из освобожденного от транскортина цитозоля не достигает уровня аккумуляции дексаметазона в области концентрации гормонов, близкой к физиологической концентрации кортикостерона в клетках. Можно допустить, что это различие обусловлено присутствием комплексобразователя III, так как он связывает не дексаметазон, а кортикостерон и должен, таким образом, ограничивать доступность естественно встречающегося глюкокортикоида для рецептора. Однако альтернативным объяснением здесь может быть предположение о разном родстве кортикостерон- и дексаметазон-рецепторных комплексов к ядрам.

Свойства глюкокортикоидсвязывающих белков, обнаруженных в сердце, свидетельствуют, что только комплексобразователь II является рецептором, обладающим уникальной способностью к передаче глюкокортикоидного сигнала в ядра при физиологических концентрациях гормонов. Однако весьма интересно, что при более высоких концентрациях (больше чем  $5 \cdot 10^{-8}$  М) транскортинсвязанная и свободная формы гормонов приобретают способность аккумулироваться ядерной фракцией в бесклеточной системе



ТАБЛИЦА 28

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ  $^3\text{H}$ -ГЛЮКОКОРТИКОИДА ВО ФРАКЦИЯХ ИЗ ЯДЕР  
(В ПРОЦЕНТАХ ОТ ВКЛЮЧИВШЕГОСЯ)

Форма и концентрация гормона, инкубированного с ядрами	Фракция на- ружной ядер- ной мембраны (тригон X= =100)	Внутриядерная фракция (0,4 М KCl)		Неэкстраги- рованная фракция
		свободная	связанная	
Цитозол, связанный с $^3\text{H}$ -дексаметазоном, $2,7 \cdot 10^{-9}$ М	50	20	22	8
Цитозол, связанный с $^3\text{H}$ -кортикостероном, $1,5 \cdot 10^{-8}$ М	60	14	12	14
Связанный с транскор- тином: $^3\text{H}$ -кортикосте- рон: $10^{-8}$ М  $10^{-7}$ М	Не обнару- жена 50	Не обнару- жена 8	Не обнару- жена 2	Не обнару- жена 40
Свободный $^3\text{H}$ -кортико- стерон: $10^{-8}$ М  $10^{-7}$ М	Не обнару- жена 35	Не обнару- жена 10	Не обнару- жена 1	Не обнару- жена 54
Свободный $^3\text{H}$ -дексаме- тазон: $10^{-8}$ М  $10^{-7}$ М	Не обнару- жена 2	Не обнару- жена —	Не обнару- жена —	Не обнару- жена —

Процедура экстракции включившегося в ядра  $^3\text{H}$ -гормона 10% тритона X=100 и 0,4 KCl описаны в [10]. Количество  $^3\text{H}$ -гормона в «неэкстрагируемой» фракции вычисляли по разности величины радиоактивности ядер перед экстракцией и величии суммарной радиоактивности в тритоне X=100 и KCl-экстрактах.

ме [10]. Но в этом случае распределение гормона, поглощенного ядрами, сильно отличается (табл. 28). Если ядра были инкубированы с  $^3\text{H}$ -глюкокортикоид-рецепторным комплексом, то почти весь включившийся в ядра гормон экстрагировался двумя обработками: тритоном X-100 (такая обработка экстрагирует внешнюю ядерную мембрану) и 0,4 М KCl (экстрагирующей так называемую фракцию растворимого хроматина). Внутриядерная фракция содержала как свободную, так и связанную форму гормона. Связанная форма включала фракцию, соответствующую по размеру приблизительно высокосолевого стероид-рецепторного комплекса (см. табл. 27). Ядра, инкубированные с транскортин-связанной и свободной формами  $^3\text{H}$ -кортикостероном, содержали

довольно большое количество неэкстрагируемого радиоактивного материала. Большая часть экстрагируемого  $^3\text{H}$ -кортикостерона приходилась на фракцию внешних ядерных мембран. Эти эксперименты подтверждают, что глюкокортикоиды способны проникать внутрь ядер в комплексе с рецептором. Тригоновые экстракты из ядер, инкубированных со свободным  $^3\text{H}$ -дексаметазоном, практически не содержали радиоактивной метки. Возможно, на внешней поверхности ядер находится некоторое количество комплексообразователя III (а также транскортина), что облегчает аккумуляцию кортикостерона, но не дексаметазона экстрагируемой тригоном фракцией. Очевидно, и рецептор способен при определенных условиях облегчать аккумуляцию гормона на внешней поверхности ядерных мембран. Если экстраполировать эти результаты с ядерными мембранами на мембраны вообще, то можно предположить, что транскортин межклеточного пространства способствует накоплению естественно встречающихся глюкокортикоидов на внешней стороне цитоплазматических мембран, а внутриклеточные глюкокортикоидсвязывающие белки — на мембранах субклеточных структур. Однако требуются еще экспериментальные подтверждения такого предположения. Если концентрация гормона в клетке превысит  $5 \cdot 10^{-8}$  M, то, по-видимому, наряду с указанным выше процессом имеется и аккумуляция внутри ядер свободной формы стероида и связывание ее с трудно экстрагируемым ядерным материалом. Правомочно задать вопрос: не обуславливает ли последний механизм токсическое действие глюкокортикоидов на клетку через неспецифическую индукцию транскрипции и последующий синтез избыточного количества ферментов? Изменения активности ряда ферментов отмечены в сердце после продолжительного введения глюкокортикоидов [11]. Этот механизм, безусловно, отличается от специфической активации генетического аппарата клетки, вызываемой взаимодействием стероид-рецепторных комплексов с внутриядерными акцепторами. Он также, по-видимому, не имеет отношения к «быстрому» прорецепторному влиянию доз глюкокортикоидов на клетки, которое непосредственно связывают со стабилизирующей гормонами клеточных и лизосомных мембран [12, 13].

В левой части схемы на рис. 100 мы попытались отобразить механизм переноса глюкокортикоидов внутрь клеточных ядер в сердце. Межклеточный пул транскортина ограничивает входение естественно встречающихся глюкокортикоидов внутрь клеток. Частично глюкокортикоид-транскортиновые комплексы аккумулируются на внешней поверхности цитоплазматических мембран. Пунктирной линией обозначен гипотетический путь глюкокортикоид-транскортиновых комплексов при условии, если транскортин способен проникать внутрь клеток. Свободная форма гормонов клеток распределяется между комплексообразователем II (рецептор) и другими связывающими белками. Активированный стероид-рецепторный комплекс транслоцирует глюкокортикоидный

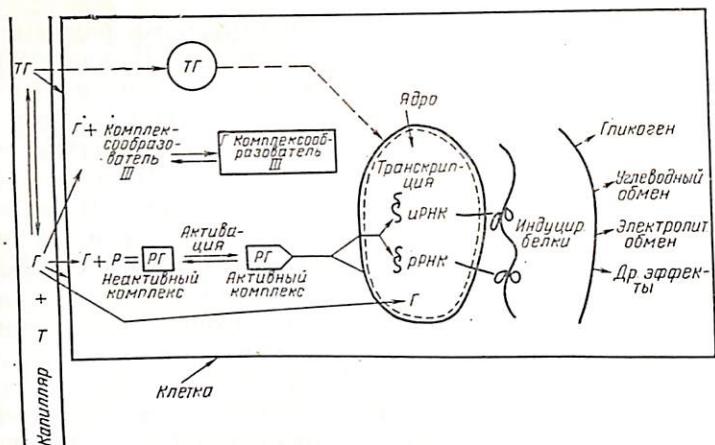


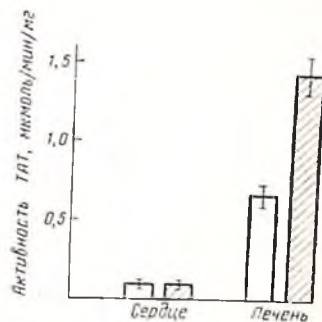
Рис. 100. Механизм переноса глюкокортикоидного сигнала.

сигнал к внутриядерному акцептору или акцепторам, где должна осуществляться специфическая активация генетического аппарата клеток. Часть стероид-белковых комплексов может аккумулироваться на внешних мембранах субклеточных структур. При фармакологических концентрациях свободная форма гормонов также способна аккумулироваться внутри ядер, связываясь с не идентифицированными пока участками.

Мы в настоящее время мало знаем о процессах, изображенных в правой части схемы на рис. 100. В действительности ли механизм транслокации стероид-рецепторного комплекса из цитоплазмы в ядрах, продемонстрированный *in vitro* на препаратах цитозоля и клеточных ядер из сердца, отражает регуляцию глюкокортикоидами активности генетического аппарата клеток сердечной ткани? Какие белки синтезируются *de novo* как прямой результат изменения глюкокортикоидами транскрипции? Как эти белки (скорее всего, ферменты) влияют на клеточный метаболизм? Судя по нашим предварительным исследованиям, а также на основании данных литературы [14, 15], представляется маловероятным, чтобы под влиянием изменения концентрации этих гормонов непосредственно можно было обнаружить драматические изменения в валовом синтезе белка. Действие этих гормонов, очевидно, связано с изменением синтеза определенных ферментов, выполняющих важные специализированные функции, но их количество по отношению к общей массе синтезируемого белка очень мало и может быть обнаружено только специальными методами.

В печени — классическом органе-мишени для глюкокортикоидов одной из наиболее хорошо изученных функций этих гормонов является активация процессов, связанных с глюконеогенезом. Например, подробно исследована индукция синтеза ферментов: трансаминирования, в частности тирозинаминотрансферазы — ТАТ [16, 17]. При неоднократном введении глюкокортикоида

Рис. 101. Влияние гидрокортизона на активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ) в сердце и печени крыс. Крысы — самцы линии Вистар массой 220—250 г, получали по 5 мг гидрокортизона на 100 г массы тела внутривенно за 6 ч до забоя. Контрольным животным вводили изотонический раствор хлорида натрия. Активность ТАТ определяли в надсодержной жидкости после центрифугирования гомогенатов тканей при 3500 g 20 мин [32]. В каждой группе животных было 12—15 крыс.



максимальное повышение активности ТАТ наблюдается с характерным лаг-периодом в 4—6 ч. Подъем активности обусловлен синтезом специфической иРНК для ТАТ и последующим синтезом этого фермента в результате трансляции индуцированной иРНК. По нашим данным (рис. 101), в аналогичных условиях изменения в активности ТАТ в сердце значительно менее выражены, чем в печени, по крайней мере у взрослых животных; индукция синтеза трансампаз глюкокортикоидами в сердце не имеет существенного значения в регуляции сердечного метаболизма.

В сердце наиболее типично проявление так называемых перmissive эффектов глюкокортикоидов. Суть их состоит в том, что глюкокортикоиды способны каким-то, по точно не установленным, образом изменять чувствительность клеток к другим гормонам и физиологически активным веществам. Для кардиологов интерес представляет способность глюкокортикоидов потенцировать эффекты катехоламинов на сердце. Потенцирующее действие глюкокортикоидов, очевидно, имеет огромное физиологическое значение, так как эффекты катехоламинов реализуются на фоне присутствия в ткани определенных концентраций глюкокортикоидов и оба типа гормональных агентов являются неотъемлемыми компонентами стресса [18]. Показано, что предварительное продолжительное введение крысам глюкокортикоидов вызывает резкое увеличение способности миокарда повышать аккумуляцию ионов Са в ответ на введение высоких доз синтетического аналога катехоламинов — изопротеренола. В нашей лаборатории найдено, что сердечная ткань адреналэктомированных крыс полностью утрачивает способность повышать включение  $^{45}\text{Ca}$  при введении высоких доз адреналина.

Кинетика изменения чувствительности к адреналину после адреналэктоми свидетельствует, что эффекты гормонов вряд ли могут быть обусловлены только прямым их взаимодействием с клеточными мембранами (рис. 102). Резкое снижение концентрации глюкокортикоидов в крови наблюдается уже через 3 ч после удаления надпочечников. Стабильное отсутствие чувствительности миокарда к адреналину отмечено лишь на 3—5-й день после опе-



Рис. 102. Изменения в аккумуляции <sup>45</sup>Са в миокарде (стимулированное адrenaлином) и концентрации кортикостерона в сыворотке крови после адrenaлэктомии. Крысы получали за 6 ч до забоя одновременно по 1 мкг/кг на 100 г массы <sup>45</sup>Са внутривенно и по 0,4 мг/100 г адrenaлина битарта под кожей. Аккумуляцию <sup>45</sup>Са в сердце и сыворотке крови определяли после растворения образцов в муравьиной кислоте. За 100% принято отношение величины аккумуляции <sup>45</sup>Са в 1 г ткани к аккумуляции в 1 мл сыворотки интактных крыс, которым адrenaлин не вводили. Уровни кортикостерона в сыворотке крови определяли по [33]. Группы животных состояли из 5—14 крыс.

рации. Введением глюкокортикоидов можно затормозить процесс потери чувствительности у адrenaлэктомированных крыс (на рисунке не показано), но для проявления их эффекта требуется много часов. В то же время введенные внутривенно глюкокортикоиды уже через несколько минут обнаруживаются в сердечной ткани. Очевидно, какие-то медленно развивающиеся процессы обуславливают в конечном счете сдвиги в чувствительности к катехоламинам. Можно предположить, что эти изменения локализованы в клеточной мембране, но подготавливаются они внутри клетки путем синтеза *de novo* определенных белков, которые способны прямо или косвенно влиять на функцию мембран. По современным представлениям, большая роль в регуляции процессов фосфорилирования и дефосфорилирования принадлежит ферментам, принимающим участие в фосфорилировании мембранных белков. Однако это предположение пока не выходит за рамки гипотезы.

В литературе можно найти много косвенных данных, свидетельствующих, что местом проявления эффектов глюкокортикоидов служит клеточная мембрана. В условиях дополнительных пагузов на организм обнаруживается действие глюкокортикоидов на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу плазматических мембран миокарда [22]. В мочевом пузыре жабы минералокортикоиды, по-видимому, участвуют в синтезе белка, который является компонентом  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса клеточных мембран [23].  $\text{K}^+$ ,  $\text{N}^+$ -АТФ-аза, как известно, регулирует и обмен ионов Са. Местом приложения эффекта

глюкокортикоидов может быть активность фосфолипазы  $A_2$ , высвобождающей арахидоновую кислоту из мембранных фосфолипидов. Арахидоновая кислота служит субстратом, лимитирующим синтез простагландинов, которые в свою очередь являются эффективными регуляторами аккумуляции ионов  $Ca$  в клетках. Хорошо известный противовоспалительный эффект глюкокортикоидов обусловлен, как считают, ингибированием синтеза  $PG$  через регуляцию активности фосфолипазы  $A_2$  [24—28]. Весьма интересно, что по способности вызывать противовоспалительные действия и по величине сродства к глюкокортикоидным рецепторам, в том числе и к глюкокортикоидному рецептору сердца, синтетические и естественно встречающиеся глюкокортикоиды можно расположить в одни и те же ряды.

Приведенные соображения позволяют предположить, что мембраны являются одним из наиболее вероятных важных пунктов изменений, вызываемых глюкокортикоидами в клетках, причем по крайней мере часть мембранных эффектов этих гормонов должна быть опосредована внутриклеточными процессами, регулируемым глюкокортикоидным рецептором.

Следует коротко остановиться на взаимоотношении процессов, опосредованных изменением уровней цАМФ и эффектами глюкокортикоидов. Существует мнение [29], что стероидные гормоны в соответствующих органах-мишенях регулируют синтез специфических белков, участвующих в активируемых цАМФ процессах фосфорилирования. Эти специфические белки еще неидентифицированы.

В сердце не обнаружено значительных изменений в уровне циклического нуклеотида при воздействии глюкокортикоидов. Однако они потенцируют эффекты, опосредованные цАМФ, например активацию гликогенфосфорилазы адреналином. Высказано предположение [30], что это связано не с изменениями в синтезе цАМФ-зависимой протеинкиназы, киназы фосфорилазы или фосфорилазы  $B$ , а с воздействием на внутриклеточную аккумуляцию ионов  $Ca$ , необходимых для активации киназы фосфорилазы. Нам установлено, что стабильное нарушение в активации адреналином фосфорилазы  $B$  сердца наступает между 3—5-м днем после удаления надпочечников, т. е. в пределах отрезка времени, когда сердечная ткань теряет способность увеличивать аккумуляцию ионов  $Ca$  в ответ на адреналин (рис. 103, а также см. рис. 102). Таким образом, изменения в активации фосфорилазы могут в принципе следовать за сдвигами в аккумуляции ионов  $Ca$ . Интересно, что в первые сутки после адреналэктомии базальный уровень фосфорилазы  $A$  в сердце значительно повышен и введение экзогенного адреналина в условиях перфузии изолированных сердец не вызывает дальнейшего увеличения активности фермента. Повышенный уровень фосфорилазы  $A$  в указанный отрезок времени обусловлен болевой травмой, по не падением концентрации кортикостероидов, так как у «ложнооперированных»



Рис. 103. Влияние адреналина на активность фосфорилазы А изолированного сердца крысы в различные сроки после адrenaлэктомии. Гликогенфосфорилазную активность определяли по [34] в надосадочной жидкости после центрифугирования гомогената сердца крысы при 3500 г. Сердца, изолированные по Лангендорфу, предварительно перфузировали раствором Кребса — Хензелляйта в присутствии или в отсутствие адреналина ( $0.5 \cdot 10^{-7}$  М). Группы содержали по 5—15 животных. Отношение активности фосфорилазы А к общей активности фосфорилазы у интактных крыс принято за 100%.

животных он также повышен (на рис. 103 не показано). Ко 2—3-му дню после ложной операции или адrenaлэктомии базальный уровень фосфорилазы А снижается до нормы. Начиная с этого периода можно наблюдать стабильную потерю чувствительности к адреналину, обусловленную дефицитом кортикостероидов.

Появились интересные данные о возможной связи между циторецептором для глюкокортикоидов и цАМФ-зависимыми процессами. Впервые [19] показана на печени способность метилксантинов (аминофиллин, теофиллин, кофеин), ингибиторов фосфодиэстеразы цАМФ, активировать неактивную форму глюкокортикоидного рецептора, причем чем более сильное ингибиторное действие оказывал метилксантин, тем сильнее он активировал циторецептор. Другие ингибиторы фосфодиэстеразы — неметилксантины — не были способны активировать рецептор. Нами способность метилксантинов активировать глюкокортикоидный рецептор была подтверждена на сердце (см. рис. 98). Поразительные данные были представлены [31] о сходстве между циторецептором для глюкокортикоидов в печени и регуляторной субъединицей цАМФ-зависимой протенинкиназы. Но может ли оказывать циторецептор для глюкокортикоидов регуляторной субъединицей протенинкиназы, еще точно не выяснено.

В заключение необходимо подчеркнуть, что наличие высокоспецифического механизма переноса глюкокортикоидного сигнала в сердце свидетельствует о возможности регуляции метаболических процессов в этом органе глюкокортикоидами через транскрипцию и синтез ферментных белков *de novo*. В регуляции переноса естественно встречающихся глюкокортикоидов в клеточные ядра участвует как экстраклеточный транспорт, так и

внутриклеточные белки — рецептор и комплексообразователь III, по-видимому, выполняющий функцию внутриклеточного ограничителя доступности гормонов для рецептора. Важным пунктом в действии глюкокортикоидов на клетки должны быть клеточные (а возможно, и внутриклеточные) мембраны. Это положение не исключает возможность прямого действия глюкокортикоидов на мембраны не через транскрипцию и синтез белков. Способность связывающих белков облегчает аккумуляцию глюкокортикоидов на поверхности мембран указывает, что те эффекты гормонов, которые обусловлены прямым взаимодействием с мембранами, вероятно, зависят от сродства стероидных молекул к связывающим белкам. При фармакологических концентрациях гормонов возможно, очевидно, как прямое взаимодействие глюкокортикоидов с мембранами, так и изменения, связанные с первичным синтезом ферментных белков.

Аккумуляция на поверхности мембран, по мнению ряда исследователей, обуславливает протекторное стабилизирующее действие глюкокортикоидов на клетки, проявляющееся достаточно быстро. С другой стороны, эффекты, зависящие от специфического или неспецифического повышения активности транскрипции и синтеза ферментов, характеризуются довольно продолжительными лаг-периодами. Это обстоятельство указывает, что протекторный и токсический эффекты высоких доз глюкокортикоидов должны быть разделены по времени.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smirnov V. N., Seleznev Yu. M., Danilov S. M., Preobrazhensky S. N., Volkova N. G., Kolpakova G. V., Kuznetsova L. A. Hormons and heart: glucocorticoid receptors. 3-rd Joint Symposium on Myocardial Metabolism, Proceedings, Williamsburg, Virginia, 1977, 1—23.
2. Seleznev Yu. M., Danilov S. M., Preobrazhensky S. N., Volkova N. G., Kuznetsova L. A., Smirnov V. N., Volchek A. G. Glucocorticoid-binding proteins and their possible role in the transfer of glucocorticoids into nuclei.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1978, 10, 877—891.
3. Seleznev Yu. M., Danilov S. M., Smirnov V. N. Separation of three glucocorticoid-binding fractions from cytosol of rat heart.—*J. Steroid Biochem.*, 1979, 10, 215—220.
4. Seleznev Yu. M., Smirnov V. N. Glucocorticoid-binding proteins and cyto-receptor in the heart. 12-th FEBS Meeting, Dresden, GDR, Abstract 1355, 1978.
5. Laurent I. C., Killander T. A theory of gell-filtration and its experimental verification.—*J. Chromatog.*, 1964, 14, 317—330.
6. Martin R. G., Ames B. N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes.—*J. biol. Chem.* 1961, 236, 1372—1379.
7. Селезнев Ю. М., Данилов С. М., Волкова Н. Г., Медведова Л. А. Активация глюкокортикоидного циторецептора сердца крысы.—*Биохимия*, 1979, 44, 245—251.
8. Siegel L. M., Monty K. I. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure system by use of gell-filtration and density gradient centrifugation.—*Biochim. biophys. Acta*, 1966, 112, 2, 346—362.
9. Calk M., Litwack G. Effect of theophyllins on activation and nuclear translocation of the hepatic glucocorticoid receptor at low temperature.—*Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, 66, 828—835.



10. *Seleznov Yu. M., Volkova N. G., Medvedeva L. A., Danilov S. M., Smirnov V. N.* Uptake and distribution of glucocorticoids in cell nuclei of rat heart in cell-free system. Dependence on concentrations and forms of added hormones.—*J. mol. cell. Cardiol.*, 1979, 11, 289—302.
11. *Свирякин В. Т., Космач П. И.* Влияние инсулина на реактивность миокарда к гидрокортизону.—*Пробл. эндокринолог.*, 1976, 22, 58—60.
12. *Libby P., Maroko P. R., Bloor C. M., Sobel B. E., Braunwald E.* Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration.—*J. Clin. Invest.*, 1973, 52, 599—607.
13. *Okuda M., Lefer A. M.* Myocardial uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -methylprednisolone in isolated cat hearts.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1977, 9, 989—1001.
14. *Bullock G. R., Carter E. E., Elliott P., Peters R. F., Simpson Sh., White A. M.* Relative changes in the function of muscle ribosomes and mitochondria during the early phase of steroid-induced catabolism.—*Biochem. J.*, 1972, 881—892.
15. *Rannels S. R., Rannels D. E., Pegg A. E., Jefferson L. S.* Differential effects of glucocorticoids on initiation of protein synthesis in skeletal muscle and heart.—*Fed. Proc.*, 1977, 36, 3, 585.
16. *Baxter J. D.* Glucocorticoid hormone action.—*Pharmacol. Ther.*, 1976, 2, 605—659.
17. *Gelehrter T. D.* Enzyme induction (third of three parts).—*New Engl. J. Med.*, 1976, 294, 646—651.
18. *Fleckenstein A.* Metabolic factors in the development of myocardial necrosis and microinfarcts.—*Triangle*, 1975, 14, 27—36.
19. *Greengard P.* Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters.—*Nature*, 1976, 260, 101—108.
20. *Kirchberger M. A., Raffo A.* Phosphoprotein phosphatase-catalyzed dephosphorylation of the 22 000-dalton phosphoprotein of cardiac sarcoplasmic reticulum. In: *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Heart Function and Metabolism*, edited by T. Kobayashi, T. Sano, and N. Dhalla, Baltimore University, Park Press, 1976, vol. 11, pp. 285—291.
21. *Sperlakis N., Schneider J. A.* A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular cell.—*Am. J. Cardiol.*, 1976, 37, 1079—1085.
22. *Кырге П. К.* Функция Na, K-насоса и его кортикостероидная регуляция как факторы, лимитирующие адаптацию сердца к большой нагрузке.—*Кардиология*, 1976, 16, 15—21.
23. *Edelman I. S.* Mechanism of action of steroid hormones.—*J. Steroid. Biochem.*, 1975, 6, 147—159.
24. *Hong S. L., Levine L.* Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids.—*Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 1730—1734.
25. *Grodzinska L., Panczenko R., Gryglewski R.* Inhibition of release of prostaglandin E-like material by non-steroid and steroid anti-inflammatory drugs.—*Acta. Biol. Med. Germ.*, 1976, 1099—1100.
26. *Gryglewski R. J.* Prostaglandins and the mechanism of drug action in circulatory system.—*Acta Biol. Med. Germ.*, 1976, 35, 8—9, 1097—1098.
27. *Gryglewski R. J., Panczenko B., Korbut R., Grodzinska L., Osetkiewicz.* Corticosteroids inhibit prostaglandin release from perfused mesenteric blood vessels of rabbit and from perfused lungs of sensitized guinea pig.—*Prostaglandins*, 1975, 10, 343—355.
28. *Foster S. J., Perkins J. P.* Glucocorticoids increase the responsiveness of cells in culture to prostaglandin  $E_1$ .—*Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 1977, 74, 4816—4820.
29. *Liu A. Y. C., Greengard P.* Regulation by steroid hormones of phosphorylation of specific protein common to several target organs.—*Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 1976, 2, 568—572.

30. Miller T. B., Exton J. H., Park C. R. A block in epinephrine-induced glycogenolysis in heart from adrenalectomized rats.—J. biol. Chem., 1971, 246, 3672—3678.
31. Литвак Д., Филлер Р., Кэйк М. Х. Рецептор глюкокортикоидов в печени и его возможная взаимосвязь с цАМФ.—Вестн. АМН СССР, 1977, 3, 42—46.
32. Левин Ф. Б. Простой спектрофотометрический метод определения активности тирозинаминотрансферазы.—Вопр. мед. химии, 1969, 15, 3, 315—317.
33. Волчек А. Г. Определение микроколичеств кортикостерона в плазме крыс методом сатурационного анализа: Науч. докл. высшей школы — Вюст. науки, 1973, 16, 126—129.
34. Stalmans W., Hers H. G. The stimulation of liver phosphorylase B by AMP, fluoride and sulfate.—Europ. J. Biochem., 1975, 54, 341—350.

УДК 612.173.1.015.31:546.32/33:015.12:577.152.361]014.46:615.22:547.930:582.937

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАРДИОСТЕРОИДА С $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-АЗОЙ МЕТОДОМ ЭПР

Р. И. ЖДАНОВ, И. М. МИРСАЛИХОВА, Ю. Ш. МОШКОВСКИЙ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, положительный инотропный эффект сердечных гликозидов связан с ингибированием транспорта ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через клеточную мембрану и параллелен ингибированию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [1]. Было предположено, что ингибирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы из сердечной мышцы представляет собой первоначальный механизм или рецептор положительно инотропного эффекта кардиостероидов — так называемый дигиталис-рецептор [2]. Из физических методов для изучения этого процесса используют лишь радиоизотопный метод [1]. Сообщалось также о фотоаффинных производных оубанина [3].

Хотя известны примеры изучения с помощью спиновых меток [4] и гидрофобных спиновых зондов конформационных перестроек в мембранных препаратах  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [4, 5], примеров использования для исследования этого фермента спиномеченых ингибиторов, в частности кардиостероидов, в литературе нет. Вообще исследование препаратов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы методом спиновых меток обычно затруднено из-за наличия в них других белков, а применение спиномеченых производных субстратов, например спиномеченого АТФ, требует высококонцентрированных препаратов АТФ-азы. Для изучения участков активного центра  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы мы предлагаем высокоаффинные спиновые зонды — спиномеченые производные ингибитора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы кардиостероида строфантидина. Поскольку стерановый скелет с лактонным циклом должен доставить нитроксильный радикал непосредственно к участку взаимодействия карденолидов с АТФ-азой,

можно надеяться получить информацию о параметрах и механизме этого процесса и, возможно, о механизме действия сердечных гликозидов.

## ВЕЩЕСТВА И МЕТОДЫ

**Химический синтез.** Нитроксил I получали, как описано ранее [6]. Схема синтеза спимеченного производного строфантидина (II) приведена на рис. 104.

**Общая методика получения спимеченных строфантидинов.** Раствор строфантидина (0,5 мМ) и нитроксильного радикала с первичной аминогруппой (0,75 мМ) в 4 мл смеси ДМФА — бензол (1 : 1) кипятят 14 ч под обратным холодильником с ловушкой Дина — Старка. Затем растворители упаривают в вакууме, а из маслообразного остатка после хроматографии на силикагеле (элюент — ацетон) выделяют спимеченное производное строфантидина (проба Легала положительна).

**Ферменты.** В работе использовали три различных препарата  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы. Микросомную фракцию головного мозга быка, содержащую  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу, получали по методу Skou [7]. Препарат АТФ-азы из сердечной мышцы свиньи выделяли, как описано ранее [8]. Очищенный препарат  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы из микросомальной фракции мозгового слоя почек свиней был получен по методу Jørgensen с использованием центрифугирования в зональном роторе [9]. Этот препарат содержал 90% белка  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы (7,9 мг белка в 1 мл). Все образцы АТФ-азы были свободны от неспецифической  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы, их хранили на холоду в 25 мМ трис-НСI-буфере с 1 мМ ЭДТА, рН 7,5.

**Определение активности.** АТФ-азную активность определяли по приросту неорганического фосфата на 1 мг белка за 1 ч. Раствор препарата АТФ-азы разбавляли равным объемом стандартного буферного раствора, содержащим 30 мМ трис-НСI, 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭДТА, рН 7,5, 37° С. К аликвотам 10 мкл раствора фермента добавляли 440 мкл стандартного буфера, а к другим 10 мкл аликвотам — такое же количество стандартного буфера, содержащего строфантин или различные концентрации спинового зонда. Пробы помещали в термостат при 37° С, реакцию начинали добавлением 50 мкл 10 мМ раствора АТФ, рН 7,5. Через 10 мин инкубации при 37° С реакцию останавливали добавлением 0,7 мл 5% раствора  $\text{HClO}_4$  и к пробам (1,2 мл) приливали реактивы для определения неорганического фосфата по «холодному» модифицированному методу Дельсалье. Уровень  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азной активности рассчитывали по разности ферментативных активностей: определяемой в инкубационной среде с полным набором ионов ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и при добавлении в эту среду 0,1 мМ строфантидина. Исходная удельная активность, в частности для препарата из мозгового слоя почек свиней, составляла 600 мкмоль  $\text{P}_i$  на 1 мг белка за час.

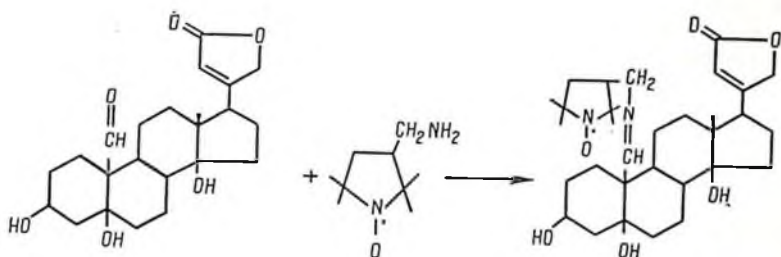


Рис. 104. Синтез спинмеченого производного строфантидина.

Содержание белка определяли по Лоури, используя в качестве стандарта для калибровочной кривой сывороточный альбумин.

Липосомы готовили из яичного лецитина озвучиванием водной дисперсии с содержанием лецитина 20 мг/мл на установке УЗДН (рабочая частота 22 кГц) (0,3% окисленности). Липосомы с холестерином содержали 5 мг/мл яичного лецитина и 2,5 мг/мл холестерина.

**Измерения методом ЭПР.** Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «Varian»  $E=9$ : при 9,4 ГГц,  $P=5$  мВт,  $H_{амп}=1$ ;  $T_{const}=0,3$  с;  $\tau=8$  мин при  $t=37^\circ\text{C}$ . Концентрацию спинзонда от  $10^{-6}$  до  $6,5 \cdot 10^{-5}$  создавали последовательным добавлением аликвот 2 мкл к 100 мкл АТФ-азы в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl, 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 4 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ ЭДТА, 1 мМ АТФ (концентрация АТФ-азы была  $10^{-5}$  М/л).

Концентрацию не связанного с ферментом спинзонда II определяли по калибровочной кривой зависимости интенсивности  $I_{+1}$  компоненты спектра ЭПР спинзонда от его концентрации в буферном растворе без АТФ-азы. Концентрацию связанного с ферментом спинзонда II вычисляли по разности общей концентрации II и концентрации зонда, не связанного с ферментом.

Время корреляции рассчитывали по формуле:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H_{+1} (\sqrt{I_{+1}/I_{-1}-1}) \cdot 10^{-10} \text{ с,}$$

где  $\Delta H_{+1}$  — ширина низкочастотной компоненты спектра ЭПР;  $\Delta H_{-1}$  — амплитуда низкочастотной и высокочастотной компонент спектра ЭПР [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все предварительные опыты по тестированию биологической активности строфантидина и его спинмеченого производного были проведены на микросомальных препаратах  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы из сердечной мышцы свиньи, из клеток коры головного мозга быка и из мозгового слоя почек свиньи (препарат содержал 90% белка  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы). В табл. 29 приведены величины concentra-

ТАБЛИЦА 29

ИНГИБИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-АЗ СТРОФАНТИДИНОМ

	$1 \cdot 10^{-7}$ M		
	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза из мозга быка	АТФ-аза из почек свиньи	АТФ-аза из сердца свиньи
Строфантин	6,50	6,25	6,50

ции 50% ингибирования ( $I_{50}$ ) этих трех препаратов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аз строфантидином. Ввиду близости этих величин, а также учитывая тот факт, что образцы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы из различных источников обладают идентичными антигенными свойствами, дальнейшие опыты были проведены на очищенном ферменте из мозгового слоя почек. Выбору этого препарата при изучении методом спинового зонда способствовало также то обстоятельство, что для экспериментов с применением ЭПР и спиновых зондов обычно используют препараты ферментов, содержащие десятки миллиграммов белка на 1 мл раствора. Из табл. 30 следует, что параметры ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы

ТАБЛИЦА 30

ИНГИБИРОВАНИЕ  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ -АТФ-АЗЫ СТРОФАНТИДИНОМ И ЕГО СПИНМЕЧЕНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ (II)

	$K_{\text{ингиб}} \cdot M \cdot 10^7$	Процент ингибирования при концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ M
Строфантин (II)	6,25	94
	5,80	98

строфантидином и его спинмеченым производным близки. Таким образом, кинетические параметры взаимодействия строфантинидина с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азой слабо меняются при введении по  $\text{C}_{19}$  радикала с аминотетильной группой (II). Это может свидетельствовать о том, что стерановый скелет взаимодействует с дигиталис-радикалом своей обратной стороной — «в», поэтому введение радикала на длинной «ножке» по  $\text{C}_{19}$  не вызывает иммобилизации радикала и изменения ингибиторных свойств. С этим предположением согласуются форма линий спектра ЭПР и значение константы сверхтонкого взаимодействия спин-зонда в комплексе с ферментом. На рис. 105 представлены спектры ЭПР спин-меченого строфантинидина (II) в буферном растворе (рис. 105, а) и в присутствии комплекса SL-Str и АТФ-азы (рис. 105, б). Эти спектры ЭПР практически идентичны, что говорит об отсутствии значительного ограничения вращательной подвижности нитроксильного фрагмента радикала ( $\tau_c \approx 6 \cdot 10^{11}$  с). Величина константы

СТС для спин-зонда II в комплексе с АТФ-азой, ах, равная 16 э, позволяет предположить, что полярность окружения нитроксильного фермента в (II) близка к полярности воды.

Результаты титрования АТФ-азы спин-зондом (IVб) согласуются с существовавшим одним типом связывающих мест для кардиостероидов с константой связывания  $K_{св} \approx 2,0 \pm 0,5 \cdot 10^5$  (в предположении, что молекулярная масса  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы 300 000).

В условиях опытов (водный раствор,  $37^\circ C$ ) спин-зонд (II) стабилен. В контрольном эксперименте из водного раствора ( $10^{-3} M$ ) (IVб) после выдерживания при  $37^\circ C$  в течение 6 ч упаривали воду. Тонкослойная хроматография на силикагеле (Л-100—160, ЧССР) показала одно пятно с  $R_f = 0,65$  (ацетон/бензол, 3/1), как у (II) до опыта.

Комплекс фермент-спин-зонд (IVб) был чувствительным к ионам  $K^+$  и строфантинину (табл. 31). Добавление избытка ионов

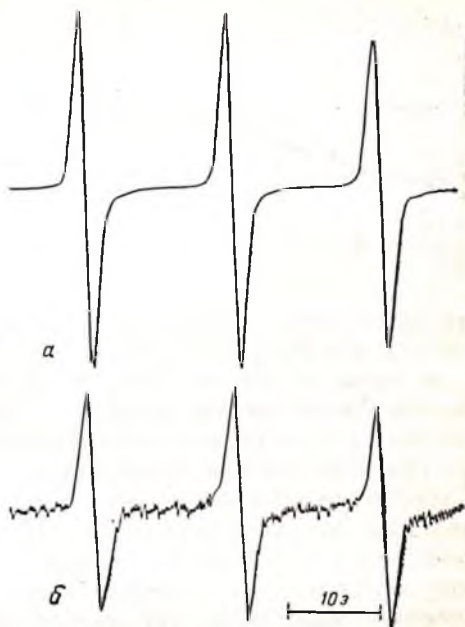


Рис. 105. Спектр ЭПР спинмеченого производного строфантинина в буферном растворе трис-HCl (а), в присутствии  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы ( $10^{-5}$  моль/л) (б).

ТАБЛИЦА 31

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ  $K^+$  И СТРОФАНТИДИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СПЕКТРА ЭПР (ОТН. ЕД.) КОМПЛЕКСА НИТРОКСИЛА (II) И АТФ-АЗЫ

	Фермент + (II) ( $2 \cdot 10^{-5} M$ )		
	—	$\pm K^+$ (40 мМ)	+ строфантинин
Интенсивность спектра ЭПР, мм ( $I_{-1}$ )	13 11	28 —	— 16

$K^+$  вызывает большее увеличение амплитуды сигнала ЭПР несвязанного радикала (т. е. большую степень диссоциации комплекса фермент-спин-зонд), чем добавление избытка строфантинина. Таким образом, нитроксил (II) сохранил свойства кардиостероида

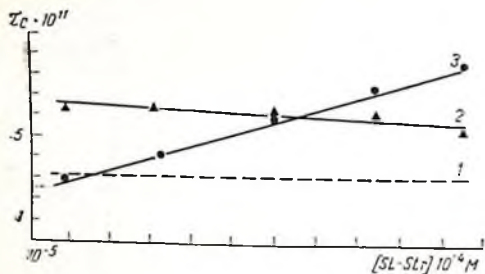


Рис. 106. Зависимость времени вращательной корреляции спинмеченого производного строфантинина от его концентрации в буферном растворе (1), в присутствии лецитиновых липосом (2), в присутствии холестерин-лецитиновых липосом (3) (см. раздел «Вещества и методы»).

строфантинина и является поэтому высокоспецифичным спин-зондом для  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы.

В связи с тем что  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-аза является интегральным белком биологических мембран, возникает вопрос о природе связывания с этим ферментом кардиостероидов. Поскольку существуют три возможности связывания: с белком, с липидной частью и с обоими вместе, мы предприняли попытку использовать эксперименты со спинмеченым строфантинидом, в частности взаимодействие с модельными мембранами, для того чтобы выбрать одну из этих возможностей. Отсутствие анизотропии вращения и величина константы СТС свидетельствуют о том, что кардиостероиды связываются не с липидной частью. При титровании лецитиновых везикул спин-зондом (II) (рис. 106) время корреляции несколько увеличивается и критически не зависит от концентрации, что также говорит о слабом взаимодействии SL-Str с фосфолипидами. Однако при титровании спин-зондом смешанных лецитип-холестеринных везикул (см. экспериментальную часть) мы наблюдали интересный эффект: с повышением концентрации SL-Str увеличивается и время корреляции  $\tau_c$  спинмеченого кардиостероида, т. е. в присутствии холестерина увеличивается сродство к модельным мембранам. При малых концентрациях сродство к таким липосомам, вероятно, незначительно.

Таким образом, ингибирующая способность строфантинина обусловлена его взаимодействием с активными центрами белка, а не с фосфолипидами, причем холестерин, очевидно, усиливает это взаимодействие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wallick E. T., Lindenmeyer G. E., Lane L. K. et al. Recent advances in cardiac glycoside— $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase interaction.—Fed. Proc., 1977, 36, 2214—2218.
2. Repke K., Portius H. J. On the identity of the ion-pump ATPase in the cell membrane of the myocardium with a digitalis-receptor enzyme (Ger).—Experientia, 1963, 19(7), 452—458.
3. Forbush B., Kaplan J. H., Hoffman J. F. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the  $Na$ ,  $K$ -ATPase.—Biochemistry, 1978, 17, 3667—3676.

4. *Boldyrev A., Ruuge E., Smirnova I., Tabak.* Na, K-ATPase: The role of state of lipids and Mg ions in activity regulation.—FEBS Lett., 1977, 80, 303—307.
5. *Райхман Л. М., Мошковский Ю. Ш.* — Мол. биол., 1974, 7, 768—771.
6. *Hsia J. C., Piette L. M.* Spin-labeling as a general method in studying antibody active site.—Arch. Biochem. Biophys., 1969, 129, 296—307.
7. *Skou J. C.* Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na<sup>+</sup>-and K<sup>+</sup>.—Biochim. biophys. Acta, 1962, 58, 314—325.
8. *Akera T., Larsen F. S., Brody T. M.* The effect of ouabain on sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species.—J. Pharmacol. exp. Ther., 1969, 170, 17—26.
9. *Jorgensen P. L.* Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)=ATPase III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulphate.—Biochim. biophys. Acta, 1974, 356, 36—52.
10. *Panusz R. T., Graczyk G., Wilmanska D., Skarzynski J.* Analysis of orthophosphatepyrophosphate mixtures resulting from weak pyrophosphatase activities.—Anal. Biochem., 1970, 35, 494—504.
11. *Бучаченко А. Л., Вассерман А. М.* — Журн. структ. химии, 1967, 8, 27—32.

УДК 612.173.1.015.31:516.32/33:015.12:577.152.361:014.46:615.22:547.918:582.937

## О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-АЗЫ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ КАРДИОТОНИЧЕСКИМИ ГЛИКОЗИДАМИ

Н. М. МИРСАЛИХОВА, Н. Ш. ПАЛЪЯНЦ, Н. К. АБУБАКИРОВ (СССР)

На современном этапе развития наших познаний о механизме действия кардиоактивных гликозидов можно считать бесспорно установленным, что присущее им воздействие на сердечную мышцу реализуется посредством взаимодействия с транспортной Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азой. Взаимодействие это осуществляется не со всей огромной молекулой фермента, молекулярная масса которого в зависимости от методов определения вычислена в пределах 250 000 — 1 000 000 [1], а лишь с активным участком, получившим в литературе название дигиталис-рецептора.

В реакции сердечный гликозид — рецептор участвует вся молекула кардиостероида, но еще до открытия биохимической основы действия кардиотонических гликозидов было ясно, что ключевую роль в положительном инотропном действии играет ненасыщенное пятичленное лактозное кольцо у карденолидов и шестичленное — у буфаденолидов. Ненасыщенные лактоны, определенным образом ориентированные по отношению к плоскости стероидного ядра, придают молекулам ту специфичность действия на сердечную мышцу, которая отсутствует у других стероидных соединений. Поэтому, естественно, и после открытия параллелиз-



ма, существующего между ингибированием  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы и положительным инотропным эффектом, основное внимание исследователей было направлено на выяснение роли лактонной группировки. На основании предположения, что через лактонное кольцо осуществляется взаимосвязь кардиостероидов с ферментом, были осуществлены значительные работы по перестройке и модификации этого обязательного элемента структуры сердечных агликонов. Что же касается остальной части молекулы, то констатировалась необходимость стеранового скелета и гидроксильной группы при  $\text{C}=3$ .

Не совсем уяснена роль сахарного компонента в механизме действия кардиостероидов. То что активность сердечных гликозидов уменьшается или увеличивается в зависимости от структуры и длины мопосахаридных звеньев, кажется фактом, само собой разумеющимся. Однако в последнее время обнаружилось, что сахара не только изменяют кардиотоническое действие, присущее агликонам, но в ряде случаев могут свести его на нет, даже если все структурные элементы стероидной части сохранились в полной неприкосновенности. Так, например, соединения дигитоксигенина и строфантидина с глюкозой по биологической активности мало чем отличаются от оубаина и других природных гликозидов. Если же в молекулу вместо глюкозы ввести глюкуроповую кислоту, такой гликозид по инотропному действию приблизительно в 10 раз уступает оубаину [2]. Замена в сахарной части спиртовой функции на карбоксильную привела к резкому снижению активности.

Мы имели возможность синтезировать карденолидные моно- и биогликозиды с дополнительными мопосахаридными остатками в положениях C-5 и C-19 [4, 5] (рис. 107). Новые соединения испытывали на ингибирование  $\text{N}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы приблизительно в тех же условиях, которые были использованы ранее [3]. Одновременно для подтверждения параллелизма между ингибированием и кардиотоническим действием у синтезированных гликозидов определяли их летальные дозы на кошках (LD).

Для определения концентрации гликозидов, вызывающей 50% ингибирование, была использована микросомальная фракция сердечной мышцы свиньи (табл. 32).

При сопоставлении связи структура — действие наиболее показательным кажется отсутствие кардиотонической активности у  $\beta\beta$ , 19-O-бис- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантидола (III). Результаты наших экспериментов с этим гликозидом перекликаются с ранее сделанным наблюдением [6], что 19-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантидола (II) не обладает кардиотоническим свойством. Его же присуща довольно высокая биологическая активность (0,099 мг на 1 кг массы кошки). В чем же причины потери активности  $\beta\beta$ , 19-O-бис- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантидолом, соединенным с L-рамнозой по гидроксилу при C-19? Наиболее вероятными являются следующие.

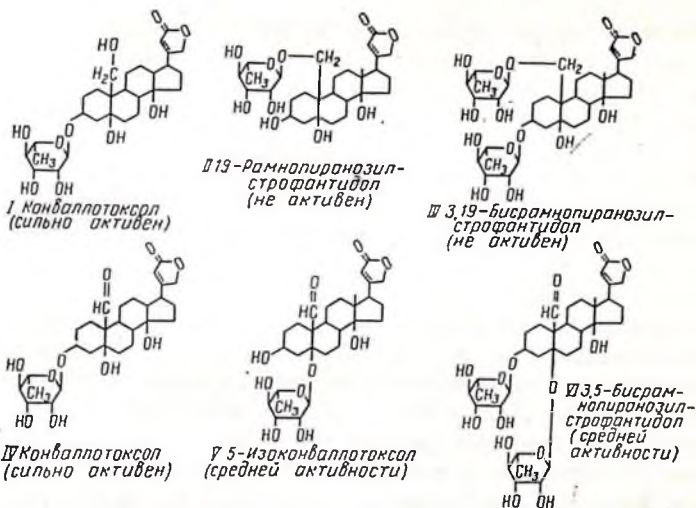


Рис. 107. Природные и синтетические гликозиды строфантидола и строфантинина с рампозой.

1. **Пространственное затруднение.** В основе биологической активности кардиостероидов лежит их очень строгая, не допускающая малейшего отклонения комплементарность с рецепторным участком фермента. При этом немаловажная роль принадлежит ангулярным группам при С-10 и С-13, выступающим за плоскость кардостеранового кольца. Все природные кардиостероиды имеют

ТАБЛИЦА 32  
ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЗИДОВ НА АКТИВНОСТЬ  
а<sup>+</sup>, К<sup>+</sup>-АТФ-АЗЫ И В ОПЫТАХ IN VIVO

Агликон и гликозид	Концентрация, вызывающая 50% ингибирование, мкмоль/л	Летальная доза для кошек, мг/кг
Строфантидол	0,60	0,700
Строфантинин	0,21	0,324
Строфантинидиновая кислота	53,0	2,649
3-Рамнопиранозил-строфантидол (I) (конваллотоксол) [6]	Не определялась	0,099
19-Рамнопиранозил-строфантидол (II) [6]	Неактивен	Неактивен
3,19-Бис-рамнопиранозил-строфантидол (III) [5]	»	»
3-Рамнопиранозил-строфантинин (IV) конваллотоксин	0,12	0,079
5-Рамнопиранозил-строфантинин (V) (5-изоконваллотоксин) [4]	5,20	0,620
3,5-Бис-рамнопиранозил-строфантинин (VI) [4]	0,47	0,172

при С-13 метильную группу. Химическая природа ангулярной группы при С-10 различна. Она может иметь вид метильной (например, дигитоксигенин, периплогенин), первично-спиртовой (строфантидол, убагенин) или альдегидной (строфантинин, нахигенин) группы. В природе встречаются агликоны и с карбоксильной группой, но нативность их строго не доказана.

Ориентировочный расчет межъядерных расстояний в ряду, где объем кислородсодержащих функций при С-10 постепенно нарастает, а остальные элементы структуры молекулы остаются без изменения (периплогенин — строфантинин — строфантидол — строфантинидиновая кислота — 19- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантидол), показывает, что критические размеры, обеспечивающие высокий кардиотонический эффект, приходится на долю строфантинина и строфантидола. Дальнейшее, даже незначительное, увеличение размера ангулярной группы приводит к серьезному нарушению комплементарности между рецептором и молекулой кардиостероида. Если строфантинидиновая кислота в какой-то степени еще игибирует  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу [3], то 19-рамнозил (II) и 3,19-бис-рамнозил-строфантидол (III) совершенно лишены этой способности. Опираясь на известное, ставшее классическим выражение Fischer, что «субстрат должен подходить к ферменту, как ключ к замку», можно высказать следующую догадку: эти два гликозида строфантидола не обладают кардиотонической активностью потому, что «бородка ключа» слишком велика, чтобы войти в паз фермента.

2. Изменение гидрофобности. Ангулярные метильные группы придают стероидным соединениям определенную гидрофобность. Не исключено, что активный центр АТФ-азы «схватывает» молекулы кардиостероидов за неполярные группы, извлекая их из водного раствора. Благодаря гидрофобному взаимодействию метильные группы помогают кардиостероидам выйти из полярной среды и перейти к рецепторному участку фермента. Метильный радикал относится к числу электроно-донорных групп и обычно повышает основность молекулы. Следовательно, вторая возможная причина потери активности у 19-рамнозил-строфантидола и 3,19-бис-рамнозил-строфантидола — повышенная гидрофильность фрагмента молекулы при С-19, препятствующая непосредственному контакту сердечного гликозида с рецепторным участком фермента (рис. 108).

Была испытана на кардиотоническую активность и эффект торможения другая группа соединений: конваллотоксин (IV), 5 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантинин (5-изоконваллотоксин, V) и 3 $\beta$ , 5 $\beta$ -O-бис- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-строфантинин (VI). Отличительной чертой двух последних соединений является наличие у них сахарной молекулы при С-5. Введение L-рамнозы не через С-5, также оказало влияние на активность кардиостероидов, но не в той резкой форме, как у 3,19-дирамнозил-строфантидола (III).

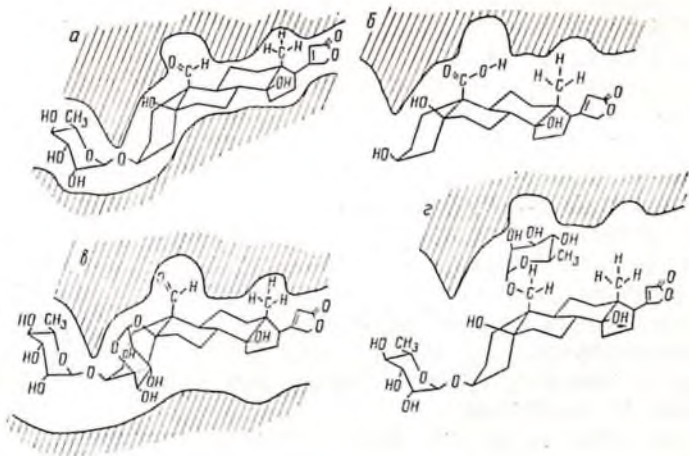


Рис. 108. Схематические модели адсорбционного центра рецепторного участка  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы. Молекула конваллотоксина (а) полностью комплементарна с рецептором. Строфантиндиновая кислота (б) обладает небольшой активностью, так как карбоксильная группа слабо контактирует с энзимным пазом для ангулярной группы. В 3,5-бисрамнопиранозиде — строфантиндине (в) сахарный остаток при С-5 и альдегидная группа при С-19 находятся над плоскостью стероидного ядра. Это соединение нарушает стерические формы энзимной щели и поэтому по активности уступает конваллотоксину. У 3,19-бисрамнопиранозила — строфантидола (г) сахарный остаток велик и обладает гидрофильностью. Контакт с поверхностью рецептора невозможен и соединение это неактивно.

Соединения V и VI оказывают ингибирующее влияние на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу, но в несколько меньшей степени чем конваллотоксин.

Почему же сердечные гликозиды разного строения обладают различной, иногда резко отличающейся друг от друга активностью? Специфичность действия кардиостероидов теснейшим образом связана со специфичностью строения рецепторного участка  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы. Строгая ориентация пептидных цепей предопределяет распределение полярных и неполярных групп, поэтому во взаимодействии с ферментом вступают только такие молекулы, которые по размерам, стерическому взаимоположению отдельных колец и функциональных групп стероидного ядра, по степени полярности, липофильности и т. д. достаточно тесно контактируют с активным центром. На наш взгляд, активный центр  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы состоит как бы из двух участков, различающихся по функциям. Один из них (назовем его адсорбционным) связывает кардиостероиды с рецептором, концентрирует и ориентирует молекулы относительно второго каталитического участка, где сосредоточены группы, вступающие в прямое взаимодействие с лактоновым кольцом. Наиболее вероятно, что адсорбция осуществляется с помощью ангулярных групп и прежде всего за счет их

гидрофобного взаимодействия с соответствующим участком рецептора. При этом на короткое время могут возникнуть нестойкие промежуточные соединения. Возможно, при связывании кардиостероидов с активным центром выделяется некая дополнительная энергия, стимулирующая работу другого участка фермента, ответственного за реакцию с участием лактонной группировки. Чем легче проникает молекула кардиостероида в ферментную «щель», чем прочнее она связывается с сорбционным центром, тем энергичнее осуществляется взаимодействие на «выходе» где первостепенная роль принадлежит лактонному кольцу. И, наоборот, если на сорбционном центре не достигнута полная комплементарность, то эффект биологического действия будет ослаблен и тем в большей степени, чем больше отклонений от оптимального положения.

По аналогии с другими ферментами не исключено, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза, вступая во взаимодействие с кардиостероидами в соответствии с известной гипотезой Кошланда, сама претерпевает некоторые конформационные изменения. Но менять пространственное расположение химических групп, составляющих рецепторный участок, опять-таки способна лишь такая молекула кардиостероида, которая лучше контактирует с сорбционным центром.

Двухцентровая модель хорошо объясняет причину того, почему сердечные гликозиды, имеющие пяти- или шестичленное лактонное кольцо, но отличающиеся друг от друга структурными элементами стероидного ядра или сахарного компонента, обладают неодинаковым кардиотоксическим свойством. В частности, рассмотренные нами карденолидные бисгликозиды с неизменным бутенолидным кольцом, но с сахарными компонентами в необычных положениях (при С-19 и С-5) потому уступают по активности применяемым в медицине гликозидам, что из-за пространственных затруднений или вследствие ослабления сил гидрофобного взаимодействия плохо укладываются в ферментной «щели», нарушают ее привычные стерические формы (см. рис. 108). Для рецепторного участка  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы характерно определенное чередование полярных и неполярных групп, поэтому если стероидная часть молекулы сердечных гликозидов связывается с сорбционным центром посредством гидрофобного взаимодействия, то сахарная часть должна вступать во взаимосвязь с дигиталис-рецептором с помощью полярных групп. Это место в какой-то степени отделено от пункта контактирования стероидной части и более приспособлено для связывания молекулы сахара. Отсутствие сахарного компонента отрицательно влияет на ипотропное действие: агликоны, как правило, менее активны, чем гликозиды.

Что касается механизма действия на каталитическом участке рецептора, то еще в 1963 г. была выдвинута гипотеза [7], что лактонное кольцо связано с активным центром водородной связью, сила которой пропорциональна дробному отрицательному заряду на карбонильной группе лактона. В этой части накоплен огромный

экспериментальный материал [1, 8], изложение которого вышло бы за рамки нашего сообщения. Экспериментальную часть данной работы см. [9].

## ВЫВОДЫ

Предложена двухцентровая модель дигиталис-рецептора, объясняющая причину разной активности сердечных гликозидов в процессе ингибирования транспортной  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы сердечной мышцы. Активный центр фермента состоит из двух участков, различающихся по функциям. Один из них, адсорбционный, связывает кардиостероид с рецептором, концентрирует и ориентирует его молекулу относительно второго, каталитического, участка, где сосредоточены группы, вступающие в прямое взаимодействие с лактоным кольцом сердечных гликозидов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thomas R., Boutagy J., Galbart A.* Synthesis and biological activity of semisynthetic digitalis analogs.—*J. Pharm. Sci.*, 1974, 63, 1649—1683.
2. *Petersen R., Flasch H., Heinz N.*—*Arzneim. Forsch.* 1977, 27(1), 642—649.
3. *Мирсалихова И. М., Умарова Р. Т., Пальянц И. Ш., Абубакиров И. К.*—*Химия природн. соед.*, 1976, 5, 188—194.
4. *Пальянц И. Ш., Горюниц М. Б., Абубакиров И. К.*—*Химия природн. соед.*, 1976, 1, 765—772.
5. *Пальянц И. Ш., Абубакиров И. К.*—*Химия природн. соед.*, 1977, 2, 125.
6. *Чернобай В. Т.*—*Журн. общ. химии*, 1964, 34, 1690—1691, 3852.
7. *Repke K.* In: *Proceedings of the Second International Pharmacological Meeting*, 1963. Prague, Czechoslovakia, 1965, 4, 65.
8. *Repke K. R. H.*—*Pharmazie*, 1972, 27, 693—701.
9. *Мирсалихова И. М., Пальянц И. Ш., Абубакиров И. К.*—*Химия природн. соед.*, 1978, 1, 95—102.

УДК: 616.12-02:613.863]-092:616.12-008.939.15-02:616.45-008.6+616.12-02:613.863]-085.243.4-039.71

## АКТИВАЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАК РЕШАЮЩЕЕ ЗВЕНО В ПАТОГЕНЕЗЕ СТРЕССОРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЕРДЦА И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ СТРЕССОРНЫХ И ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ АНТИОКСИДАНТОМ ИОНОЛОМ

Ф. З. МЕЕРСОН, Л. Ю. ГОЛУБЕВА, В. Е. КАГАН,  
М. В. ШИМКОВИЧ, А. А. УГОЛЕВ (СССР)

Важная роль эмоционального стресса в этиологии основных заболеваний кровообращения в настоящее время бесспорна. Однако молекулярный механизм, через который высокие концентрации

катехоламинов и глюкокортикоидов, реализующиеся при стрессе, повреждают сердце, остается во многих отношениях неясным. Это существенно ограничивает возможности химической профилактики стрессорных повреждений. Один из подходов к данной проблеме основан на наблюдении, что высокие дозы катехоламинов [1] и продукт окисления катехоламинов — адренохром [2] активируют перекисное окисление липидов сердечной мышцы, а гидроперекиси липидов, образующиеся в процессе перекисного окисления, могут в условиях *in vitro* повреждать мембраны СПР и сарколеммы мышечных клеток [3]. На основе этих факторов мы предположили, что именно активация перекисного окисления липидов, индуцированная избытком катехоламинов, может явиться решающим звеном в патогенезе стрессорного повреждения сердца, и в таком случае стрессорное повреждение можно предотвратить с помощью достаточно мощных антиоксидантов, блокирующих перекисное окисление [4, 5].

Для проверки этого предположения у крыс был воспроизведен эмоционально-болевого стресс (ЭБС) в форме так называемого невроза тревоги по известной методике Desiderato и соавт. [13]. Главный момент этого стрессорного воздействия состоит в том, что животные в течение 6 ч напряженного ожидания электроболевого удара действительно получают такие удары через случайные промежутки времени. В результате возникает активация адренергической и гипофизарно-адреналовой систем, которая достигает максимума во время стрессорного воздействия и продолжается по меньшей мере 4—5 сут после его завершения. При этом многократное повышение концентрации катехоламинов и глюкокортикоидов в крови закономерно приводит к развитию язвенных поражений слизистой оболочки желудка [5] и к нарушениям функции и метаболизма сердца [6].

На первом этапе исследования были изучены влияние этого тяжелого ЭБС на перекисное окисление липидов (ПОЛ), состоящие из лизосом, структуру и функцию миокарда. Проводили определение первичных молекулярных продуктов — гидроперекисей полиеновых липидов и конечных продуктов ПОЛ — флюоресцирующих шиффовых оснований в сердце, скелетной мышце и мозге крыс, перенесших стресс. Липиды из этих органов выделяли по методу Folch и соавт. [15]. Накопление гидроперекисей в полиеновых липидах оценивали по характерному для диеновых конъюгатов УФ-спектру поглощения раствора липидов в смеси метанол/гексан (5 : 1), принимая коэффициент молярной экстинкции при  $\lambda_{\text{макс.}} 232 \text{ нм}$ , равным  $2,1 \cdot 10^4 \text{ Мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [11]. Спектры регистрировали на спектрофотометре «Chimadzu». Конечные продукты ПОЛ — продукты взаимодействия короткоцепочечных диальдегидов с аминофосфолипидами — регистрировали по спектром возбуждения ее при 360 нм и максимумом испускания в области 420—440 нм на спектрофлуориметре «Aminco-Bowman».

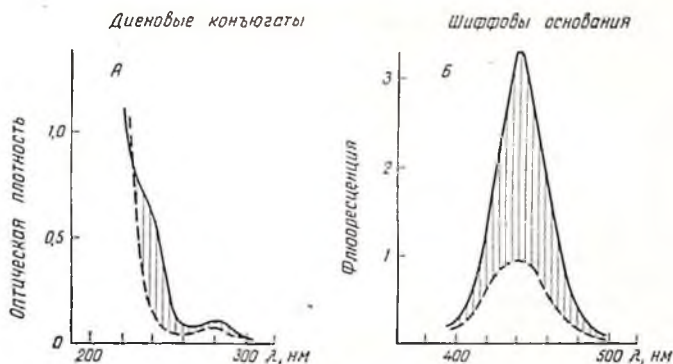


Рис. 109. Влияние эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на УФ-спектры поглощения (а) и испускания (б) липидов, выделенных из сердечной мышцы.

На рис. 109 (слева) представлены типичные УФ-спектры поглощения, справа — спектры испускания флюоресценции растворов липидов, выделенных из сердечной мышцы контрольных и перенесших ЭБС животных. На рисунке видно, что липиды, выделенные из сердец животных, перенесших ЭБС, обладают характерным для гидроперекисей полиеновых липидов спектром поглощения с максимумами при 230—235 и 270—280 нм, практически отсутствующими в контроле. Очевидно далее, что интенсивность флюоресценции шиффовых оснований, являющихся конечными продуктами ПОЛ, существенно выше для липидов животных, перенесших ЭБС, чем в контроле. Зантрихованные зоны на рис. 109 отражают накопление промежуточных и конечных продуктов ПОЛ при ЭБС.

ТАБЛИЦА 33  
НАКОПЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПОЛ ПРИ ЭБС

Показатель	Группа животных	Миокард	Скелетная мышца	Мозг
Гидроперекиси липидов (единицы оптической плотности)	Контроль n = 10	0,35 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,15 ± 0,05
	ЭБС n = 11	0,90 ± 0,05	0,80 ± 0,10	0,25 ± 0,05
Достоверность различий		p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01
Флуоресценция шиффовых оснований (относительные единицы)	Контроль n = 10	19,1 ± 2,9	13,0 ± 1,7	3,3 ± 0,4
	ЭБС n = 11	95,5 ± 20,8	35,3 ± 20,8	20,0 ± 1,5



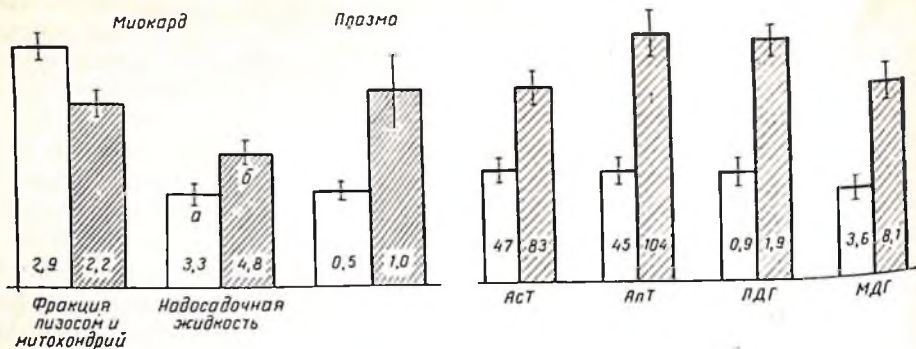


Рис. 110. Влияние эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на активность катепсина сердечной мышцы и плазмы (в миллиграммах тирозина на 1 мг белка в час). Светлые столбики — контроль, заштрихованные — ЭБС.

Рис. 111. Влияние эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на активность ферментов плазмы (в условных единицах на 1 мл, активность лактатдегидрогеназы — в микрограммах НАД·Н<sub>2</sub> в 1 мин на 1 мл). Светлые столбики контроль, заштрихованные — ЭБС.

Из табл. 33 следует, что в сердечной мышце содержание гидроперекисей возрастает под влиянием ЭБС в 3 раза, а интенсивность флюоресценции конечных продуктов ПОЛ — в 5 раз; для скелетных мышц соответствующие величины составляют 2,0 и 2,7, а для мозга — 1,7 и 2,1. Таким образом, после перенесенного ЭБС в организме происходит активация процесса ПОЛ, выраженная в сердце больше, чем в других органах.

Поскольку перекиси липидов способны разрушать мембранные структуры клеток, дальнейшие исследования были направлены, во-первых, на изучение состояния лизосом, лабильности которых под влиянием перекисей липидов могла бы составить следующее звено патогенетической цепи стрессорного повреждения сердечной мышцы, и, во-вторых, на измерение активности ферментов в плазме крови, так как именно выход ферментов из клеток в кровь может явиться непосредственным результатом повреждения клеточных мембран.

Диаграмма на рис. 110 показывает, что ЭБС приводит к снижению активности кислых катепсинах во фракции лизосом и митохондрий миокарда на 25—40% и одновременно увеличивает активность этих ферментов в надосадовочной фракции на 45—70%. Этот сдвиг с известной долей вероятности свидетельствует, что под влиянием ЭБС происходят лабильность мембран лизосом и освобождение из них протеолитических ферментов. С таким пониманием согласуются представленные в той же диаграмме данные о том, что ЭБС приводит к двукратному увеличению активности катепсинах в плазме крови. Из диаграммы на рис. 111 следует, что через 2 ч после ЭБС ферментативная активность аспартаттрансаминазы, аланин-трансаминазы, лактатдегидрогена-

зы, малатдегидрогеназы в плазме крови была увеличена примерно в 2 раза.

Таким образом, после перенесенного стресса наряду с активацией ЦОД, а возможно, под влиянием его продуктов наблюдаются лабильзация лизосомальных мембран и освобождение лизосомальных протеолитических ферментов в цитоплазму и плазму крови. Одновременно в организме возникают более широкие повреждения клеточных мембран, которые становятся причиной выраженной ферментемии. В дальнейшем важно было выяснить, к каким морфологическим изменениям сердечной мышцы приводит это повреждение мембран. Для этого серийные топографические срезы сердечной мышцы толщиной 5—7 мк окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону, коллоидным железом по Хейлу и Селье; ставилась реакция Перльса с последующей окраской гематоксилин-эозином. Проводились ШИК-реакция и реакция по Браше. Для оценки состояния сократительного аппарата мышечных клеток сердца и характера изменений миофибрилл использовали метод поляризационной микроскопии [8]. Главный установленный в морфологических исследованиях факт состоит в том, что уже в ближайшие часы после стресса в мышечных клетках сердца развиваются очаговые изменения контрактурного типа; прогрессируя, они достигают максимума, т. е. приводят к полной контрактуре мышечных клеток через 39—45 ч. В одних случаях контрактура сопровождается выраженными некробиотическими изменениями и приводит к гибели мышечных клеток с последующей их резорбцией и образованием фибробластических гранулем, в других происходят обратное развитие контрактуры и восстановление клеточных структур.

На рис. 112 показан миокард через 45 ч после ЭБС, т. е. в фазе максимальных морфологических изменений. Рис. 112, а отражает результаты поляризационной микроскопии и демонстрирует глубокую контрактуру со сливанием дисков А миофибрилл, образующих в отдельных волокнах сплошные анизотропные конгломераты; на рис. 112, б при меньшем увеличении показано большое количество таких контрактурно измененных мышечных волокон с большой анизотропией. На рис. 112, в показаны результаты реакции Перльса и видны группы некробиотически измененных мышечных волокон с положительной реакцией на железо; наконец, на рис. 112, г показано формирование клеточного инфильтрата вокруг некротизированных мышечных волокон. В очаге некроза видны некротические измененные ядра, гомогенизация мышечных волокон.

Оценивая факт, что под влиянием стресса развиваются очаговые контрактурные изменения мышечных клеток сердца, следует иметь в виду, что концентрация АТФ в миокарде животных, перенесших ЭБС, не отличалась от контроля как в покое, так и при максимальной нагрузке на сердце. Следовательно, очаговые контрактуры мышечных клеток трудно объяснить гипоксическим или



ным дефицитом богатых энергией соединений. Наиболее вероятной причиной такого рода контрактур является нарушение мембранного транспорта  $Ca$ , так как активное удаление этого катиона из миофибрилл в хранилище сарколеммы и саркоплазматического ретикулума составляет основу нормального расслабления, а очаговые контрактуры после стресса представляли собой не что иное, как очаговые нарушения расслабления. Таким образом, намечается возможность, что при стрессе перекиси липидов и протеолитические лизосомные ферменты повреждают мембранный аппарат транспорта  $Ca$  и как следствие возникают очаговые контрактуры повреждения миокарда. Для того чтобы оценить реальность этого предположения, целесообразно рассмотреть данные, характеризующие влияние стресса на сокращение и расслабление сердечной мышцы.

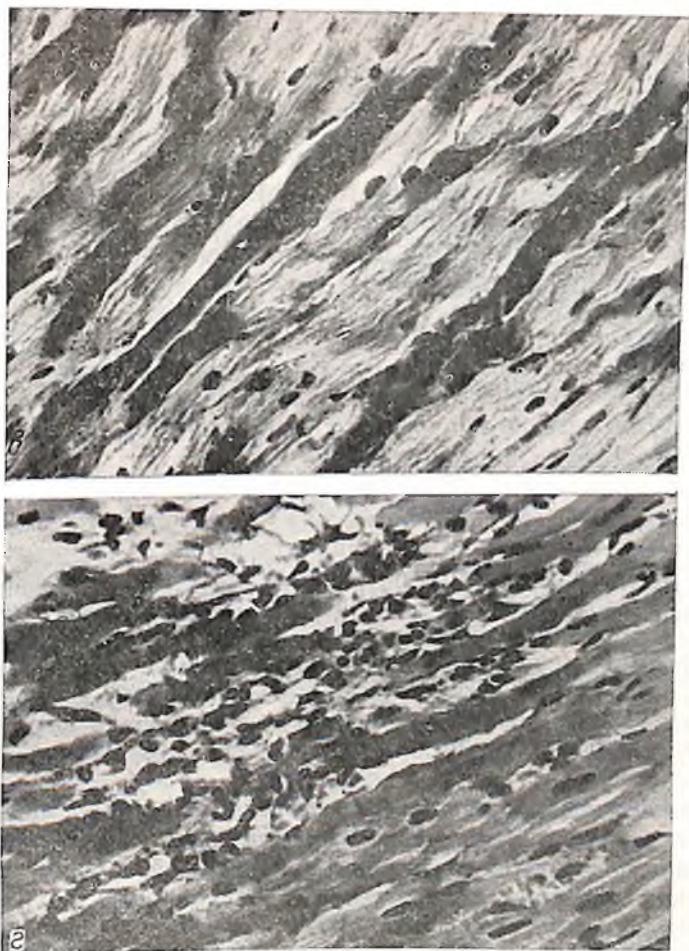


Рис. 112. Повреждения миокарда крысы через 45 ч после эмоционально-болевого стрессорного воздействия:

а — съемка в поляризованном свете.  $\times 197$ ; б — то же,  $\times 49$ ; в — реакция Перльса.  $\times 126$ ; г — окраска гематоксилин-эозином.  $\times 49$ . Остальные объяснения в тексте.

Для оценки влияния ЭБС на сократительную функцию миокарда исследования проводили на папиллярной мышце по методу Sonnenblick и на целом работающем сердце. Эти эксперименты протекали в условиях, когда миокард был удален из-под спектра регуляторных влияний целого организма и, следовательно, обнаруженные нарушения сократительной функции могли зависеть только от достаточности стойких повреждений структуры и метаболизма, оставшихся после перенесенного стресса. Выяснилось, что скорость и амплитуда сокращения папиллярных мышц животных, перенесших стресс, были снижены на 40%, в такой же мере снижена скорость расслабления, в несколько раз уменьшен по-

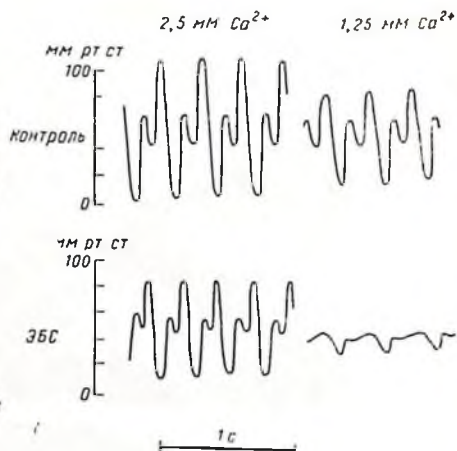
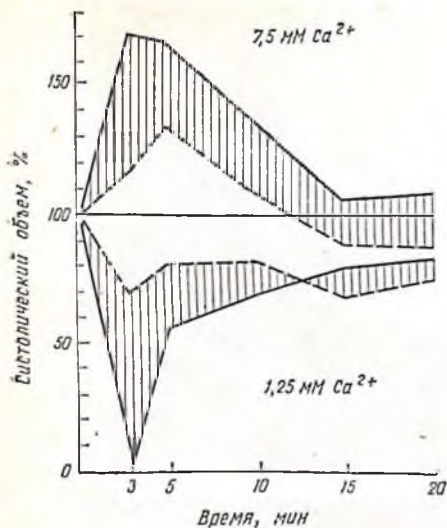


Рис. 113. Динамика реакций изолированного работающего сердца контрольных животных (пунктирная линия) и животных, перенесших эмоционально-болевого стресс (сплошная линия), на изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в перфузионном растворе.

Рис. 114. Влияние снижения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в перфузате на давление, развиваемое в аорте изолированным работающим сердцем контрольных животных (верхние кривые) и животных, перенесших эмоционально-болевого стресс (нижние кривые).

ложительно инотропный эффект высокой частоты, значительно снижена адренореактивность. В то же время максимальное напряжение, развиваемое папиллярной мышцей в изометрических условиях, связанное, как известно, с наибольшим расходом АТФ и потреблением кислорода, под влиянием стресса существенно не изменилось. Это позволяет думать, что депрессия скорости и амплитуды сокращения, возникающая после стресса, не зависит от дефицита энергии, а имеет иную причину, например нарушение мембранного транспорта  $\text{Ca}$  в миокардиальных клетках. В пользу такого предположения свидетельствуют данные, полученные при изучении работающего изолированного сердца по Neely [19]. Главный факт, обнаруженный в этих экспериментах, состоял в том, что реакция сердца животных, перенесших стресс, на изменение концентрации  $\text{Ca}$  в перфузате резко увеличилась.

В нижней части рис. 113 показано, что при снижении концентрации  $\text{Ca}$  в перфузате с 2,5 до 1,25 мМ максимальное ответное снижение ударного объема изолированных сердец контрольных животных составляло менее 40%, а сердца животных, перенесших стресс, снижали ударный объем до 0, т. е. на 100%. В верхней части этого рисунка видно, что при последующем увеличении концентрации  $\text{Ca}$  с 1,25 до 7,5 мМ ответный подъем

ударного объема составлял в контроле 20—40%, а для сердец животных, перенесших стресс, — 80%. Эти сдвиги выражены в первые 3—5 мин после изменения концентрации Са; в дальнейшем функция сердца в обеих сериях постепенно возвращается к исходному уровню за счет адаптации механизмов ионного транспорта.

Кривые на рис. 114 позволяют проследить то же явление по кривым аортального давления. В верхней части рисунка видно, что через 3 мин после уменьшения концентрации Са с 2,5 до 1,25 мМ систолическое давление в контроле спизилось примерно на 20 мм; в нижней части рисунка показано, что сердце животного, перенесшего стресс, ответило на такое же уменьшение концентрации Са огромной депрессией систолического давления.

Таким образом, несомненно, что после перенесенного стресса в сердечной мышце животных развиваются изменения, которые резко повышают зависимость сократительной функции сердца от концентрации Са в омывающей жидкости. Оценивая этот факт, следует иметь в виду данные сравнительной физиологии о том, что реакция мышцы на изменение внешней концентрации Са зависит от мощности механизмов транспорта этого катиона. Так, в скелетной мышце развитая система СПР обеспечивает положение, при котором почти весь Са, покидающий во время потенциала действия цистерны СПР и вызывающий сокращение миофибрилл, затем возвращается в его каналы. В результате такой стопроцентной рециркуляции Са скелетная мышца может сокращаться в бескальциевом растворе в течение нескольких часов. В клетках сердечной мышцы млекопитающих мощность механизмов транспорта Са, локализованных в СПР и сарколемме, не столь велика; рециркуляция не является стопроцентной и соответственно в бескальциевом растворе сердца останавливаются, совершив несколько десятков сокращений. Наконец, в сердце лягушки СПР развит незначительно, и после устранения Са из раствора сердце останавливается мгновенно [18].

Эти данные позволяют думать, что возросшая зависимость сердца животных, перенесших стресс, от внешней концентрации Са является результатом повреждения мембранных механизмов его транспорта в миокардиальных клетках — результатом снижения способности сарколеммальных и саркоплазматических мембран захватывать и накапливать Са.

В целом изложенное согласуется с предположением, что доказанная нами при стрессе активация ПОЛ является решающим звеном стрессорного повреждения сердечной мышцы, так как гидроперекиси могут повреждать мембраны лизосом и мембраны систем, ответственных за транспорт Са, а в итоге развиваются очаговые контрактуры и нарушения сократительной функции сердца в целом.

Очевидно, что наш более прямой путь проверки этого предположения состоит в том, чтобы перед возникновением стресса за-

блокировать активацию ПОЛ достаточно мощным антиоксидантом, исключить, таким образом, накопление гидронперекисей и выяснить, будут ли при этих условиях развиваться повреждение сердечной мышцы и нарушение сократительной функции сердца. С этой целью на втором этапе исследования нами использован мощный и нетоксичный антиоксидант ионол, эффективно подавляющий ПОЛ [9], но до сих пор не применявшийся в кардиологии. Ионол вводили внутривенно в дозе 120 мг/кг ежедневно в течение 3 дней перед стрессорным воздействием. Материалы, приведенные в табл. 34, свидетельствуют, что наблюдаемое после

ТАБЛИЦА 34

ВЛИЯНИЕ ИОНОЛА НА АКТИВАЦИЮ ПОЛ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ЭБС

Серия	Накопление гидроперекисей: липидов по данным УФ-спектроскопии, нмоль на 1 кг липидов	Интенсивность флюоресценции шиффовых оснований, гопт. ед.
1. Контроль n = 5	16,7 ± 1,4	10,5 ± 3,5
2. Стресс n = 7	47,6 ± 2,4	27,6 ± 4,2
3. Ионол n = 7	16,7 ± 0,5 $p_{1-2} < 0,001$	10,6 ± 2,2 $p_{1-2} < 0,01$
4. Ионол + стресс n = 7	28,6 ± 2,4 $p_{2-4} < 0,001$	13,2 ± 1,8 $p_{2-4} < 0,01$

стресса многократное увеличение в миокарде содержания гидроперекисей и шиффовых оснований в значительной мере предупреждается введением ионола. На содержание перекисного окисления в сердечной мышце контрольных животных ионол достоверно не повлиял. Дальнейшие исследования показали, что ионоловая блокада перекисного окисления предотвращает лабилизацию лизосом, развитие в миокарде очаговых контрактурных поражений и нарушений сократительной функции, выявляемых у перенесших стресс животных при изучении папиллярной мышцы и целого работающего сердца. Для окончательного решения вопроса о профилактическом влиянии ионоловой блокады перекисного окисления на стрессорные повреждения сердца, помимо этих критериев, было использовано изолированное изоволюмическое сердце по Fallen и соавт. [14]. В экспериментах на таком сердце параллельно регистрации сократительной функции брали пробы перфузата, прошедшего через коронарное русло, и с помощью метода Bergmeier [10] определяли активность фермента креатинфосфокиназы (КФК). Выход КФК из миокарда, как известно, является одним из наиболее надежных критериев повреждения клеток сердечной мышцы и при гипоксии закономерно возрастает пропорционально степени снижения концентрации АТФ в миокарде [20]. Соответственно программе эксперимента предусматривала проведение гипоксической пробы, во время ко-

торой насыщение перфузионного раствора кислородом на 20 мин снижалось с 96 до 20%. Во время гипоксической пробы закономерно развивалась депрессия сократительной функции и значительно возрастало освобождение КФК из миокарда.

В табл. 35 приведены данные об освобождении КФК из изолированного сердца в перфузат. Видно, что сердца контрольных

ТАБЛИЦА 35

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ИОНОЛА НА АКТИВНОСТЬ КФК В ПЕРФУЗАТЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕРДЕЦ КРЫС

Серия	Активность КФК, $\mu$ l		
	35 мин перфузии	95 мин перфузии	20 мин гипоксии
1. Контроль n = 8	46,86 ± 6,7	19,65 ± 2,16	31,64 ± 3,78
2. Стресс n = 7	86,55 ± 10,52	29,55 ± 1,89	47,26 ± 5,25
3. Ионол n = 8	16,11 ± 4,31	8,80 ± 2,59	10,02 ± 3,62
4. Ионол + стресс n = 7	18,44 ± 4,85	10,57 ± 1,27	18,70 ± 1,96
	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,001$	$< 0,01$ $< 0,01$ $< 0,01$ $< 0,001$	$< 0,05$ $< 0,01$ $< 0,02$ $< 0,01$

животных через 35 мин после начала перфузии освобождают в перфузат много КФК, а через 95 мин количество освобожденной КФК уменьшается более чем вдвое. Такая динамика освобождения КФК была ранее продемонстрирована другими исследователями [17] и определяется тем, что во время выделения сердца и подключения его к установке миокард повреждается гипоксией, а затем при длительной работе сердца в условиях хорошей оксигенации этот повреждающий фактор перестает действовать. Гипоксическая проба, проведенная в таких условиях, вновь приводит к значительному выходу КФК. Для сердец животных, перенесших стресс, динамика освобождения КФК остается такой же, как в контроле, но абсолютные величины активности освобожденной КФК оказались на всех этапах увеличенными в 1½ раза и более. Таким образом, стресс снижает резистентность сердца к гипоксическому повреждению, возникающему во время препаровки или вызванному специальной гипоксической пробой.

Ионол, вводимый интактным животным, снизил освобождение КФК по сравнению с контролем в начале перфузии почти втрое, при длительной перфузии в условиях достаточной оксигенации — более чем вдвое и во время гипоксической пробы — в 3 раза. Иными словами, предварительное введение ионола, несомненно, повышает резистентность сердца к гипоксическому повреждению.



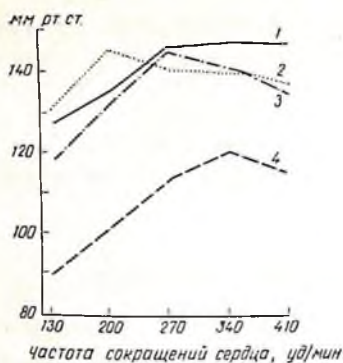


Рис. 115. Влияние перенесенного стресса и ионола на силу сокращения левого желудочка изолированного сердца крысы при навязывании нарастающей частоты сокращений.

1 — контроль; 2 — ионол; 3 — ионол + ЭБС; 4 — ЭБС.

Далее из табл. 35 следует, что сердца животных, которые получали ионол перед стрессом, освобождали КФК на всех этапах эксперимента примерно так же, как сердца интактных животных, получавших ионол. Следовательно, ионол предупредил как повреждающее действие гипоксии, так и потенцирующий эффект стресса, вызванный этим повреждением.

Данные о сократительной функции сердец, сокращающихся в изоволюмическом режиме, т. е. тех же сердец, для которых определяли освобождение КФК, приведены на рис. 115. Видно, что при равной частоте сокращений, навязанной электростимулятором, давление, развиваемое сердцами животных, перенесших стресс, было снижено по сравнению с контролем примерно на  $\frac{1}{3}$  ( $p < 0,05$ ). У животных, перенесших стресс на фоне введения ионола, этот дефект сократительной функции отсутствовал; у интактных животных, получавших ионол, развиваемое давление также не отличалось от контроля.

Кривые на рис. 116 отражают реакцию изоволюмических сердец на гипоксическую пробу. В левой части рисунка видно, что после возникновения гипоксии развиваемое систолическое давление круто падает; для сердец животных, перенесших стресс, это падение происходит от более низкого уровня и соответственно пунктирная кривая лежит ниже трех других кривых. Начиная с 10-й минуты гипоксии развиваемое давление становится весьма низким и практически одинаковым для сердец животных всех серий (8—9 мм рт. ст.). Восстановление сократительной функции после устранения гипоксии происходит по-разному для сердец животных различных серий. Медленнее всего восстанавливают сократительную функцию сердца животных, перенесших стресс. Через минуту после устранения гипоксии давление, развиваемое этими сердцами, составляет всего 25 мм рт. ст., в то время как у контрольных животных оно равно 33—34 мм рт. ст., а у интактных животных, получавших ионол, — около 50 мм рт. ст. В дальнейшем эти различия сохраняются: через 20 мин «стресс» составляет 58% исходного, существовавшего до гипок-

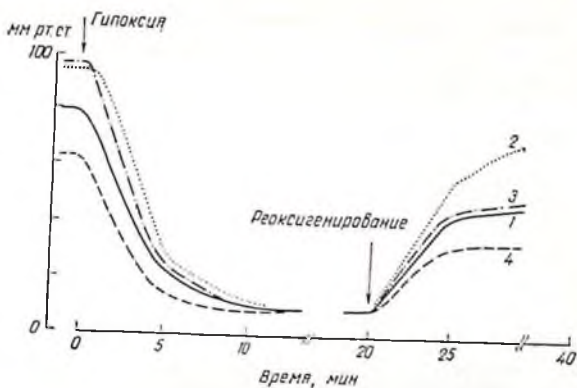


Рис. 116. Нарушения сократительной функции изолированного сердца, вызванные перенесенным стрессом и гипоксией; предупреждение этих нарушений ионолом. Цифровые обозначения те же, что и на рис. 115.

сии, для серии «ионол + стресс» и для контрольной серии — 74—75% исходного и, наконец, для сердец интактных животных, получавших ионол, — около 90%. Таким образом, стресс потенцирует гипоксическое повреждение сердца по данным о выходе ферментов и одновременно тормозит постгипоксическое восстановление сократительной функции сердца. Предварительное введение ионола полностью устраняет потенцирующий эффект стресса на повреждение сократительной функции в постгипоксическом периоде. Наконец, введение ионола интактным животным полностью защищает сердца от гипоксического повреждения по критерию выхода КФК и одновременно резко стимулирует восстановление сократительной функции в постгипоксическом периоде.

На основании изложенного можно выделить два основных положения. Во-первых, введение животным нетоксических доз антиоксиданта ионола полностью предупреждает большую активацию ПОЛ, закономерно развивающуюся в миокарде под влиянием стресса. Одновременно оказываются устраненными стрессорное повреждение сердца, оцениваемое по выходу КФК из миокардиальных клеток, и стрессорные нарушения сократительной функции. Следовательно, активация ПОЛ является необходимым решающим звеном в патогенетической цепи стрессорного повреждения сердца. Во-вторых, введение ионола предупреждает гипоксическое повреждение сердца, оцениваемое по выходу КФК из миокарда, и существенно увеличивает скорость и степень постгипоксического восстановления сократительной функции сердца при реоксигенации.

Эти результаты, а также данные других исследователей о положительном влиянии антиоксидантов при ишемическом поврежде-

нии сердца [1, 2, 7] свидетельствуют, что клинико-физиологическое изучение профилактического и терапевтического применения антиоксидантов в кардиологии является перспективным.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коган А. X., Кудрин А. И., Николаев С. М. К вопросу о роли свободно-радикального перекисного окисления липидов в механизме повреждения миокарда адреналином. — В кн.: Материалы симпозиума «Свободно-радикальное окисление липидов в норме и патологии». М.: Наука, 1976, с. 71.
2. Кудрин А. И., Коган А. X., Струков А. И. и др. Антиоксиданты и инфаркт миокарда. — В кн.: Материалы II Международного конгресса по патологической физиологии. Прага, 1975, с. 216.
3. Каган В. Е., Чуракова Т. Д., Карагодин В. И. и др. Нарушения ферментных систем транспорта  $Ca^{2+}$  в мембранах саркоплазматического ретикулума при действии гидроперекисей фосфолипидов и гидроперекисей жирных кислот. — Бюл. экпер. биол., 1979, № 2, с. 145—149.
4. Меерсон Ф. З. Нарушения метаболизма и функции сердца под влиянием эмоционально-болевого стресса и их профилактика. — Кардиология, 1979, № 6.
5. Меерсон Ф. З., Гибер Л. М., Марковская Г. И. и др. Профилактика нарушения сократительной функции сердца и язвенных поражений желудка с помощью оксипутирата натрия и витамина Е. — Докл. АН СССР, 1977, т. 237, № 5, с. 1230—1233.
6. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Якушев В. С., Камилев Ф. X. Профилактика нарушений энергетического метаболизма при эмоционально-болевым стрессе с помощью гамма-оксипутирата натрия. — Кардиология, 1978, № 3, с. 52—60.
7. Николаев С. М. Влияние селенита натрия на течение экспериментального инфаркта. — В кн.: Материалы 3-го Всероссийского съезда фармацевтов. Свердловск, 1975, с. 346—347.
8. Семенова Л. А., Целлариус Ю. Г. Ультраструктура мышечных клеток сердца при очаговых метаболических повреждениях/АН СССР, Сибирск. отд. — Новосибирск, 1978.
9. Эмануэль И. М., Липчина Л. П. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов ценных окислительных процессов. — Докл. АН СССР, 1958, т. 121, № 1, с. 141—144.
10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse.—Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
11. Bolland I. L., Koch H. P. The course of autooxidation reaction in polyisoprenes and allied compounds. Pt. 9. The primary thermal oxidation product of ethyl linoleate.—J. Chem. Soc., 1945, 7, 445—451.
12. Csallany A. S., Ayal K. U. Quantitative determination of organic solvent soluble lipofuscin pigments on tissues.—Lipids, 1976, 11, 412—417.
13. Desiderato O., McKinnon I. R., Hisson H. Development of gastric ulcers in rats following termination.—J. Comp. Physiol. psychol., 1974, 87, 208—214.
14. Fallen E. T., Elliot W., Gorlin R. Apparatus for study of ventricular function and metabolism in the isolated perfused rat.—J. Appl. physiol., 1967, 22, 4, 836—839.
15. Folch I., Lee M., Sranley G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues.—J. biol. Chem., 1957, 226, 497—509.
16. Gudbjarnason S., Doell B., Oskarsdottair G., Hallgrimsson J. Modification of cardiac phospholipids and catecholamine stress tolerance.—In: Tocosterdam—New York, 1978, p. 297—310.
17. Miller D. G., Mallov S. Quantitative determination of stress-induced myocardial damage in rats.—Pharmacol. Biochem. Behavior, 1977, 7, 139—145.

18. *Moraá M.* Contracture and catecholamines in mammalian myocardium.—*Science*, 1962, 166, 505—506.
19. *Neely J. R., Libermeister H., Battersby E. J., Morgan H. E.* Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart.—*Am. J. Physiol.*, 1967, 212, 804—814.
20. *Spiekerman F. G., Gerhard M. M., Nordbeck H.* Myocardial high energy phosphates and enzyme release during anaerobiosis in the isolated perfused dog heart.—In: Abstracts International Symposium. International Study. Group for Research in cardiac metabolism. Bruxelles, 1975, p. 41.

УДК 612.173.1:612.397.2+616.12-007.61-07:616.12-008.939.15-074

## О СОТНОШЕНИИ ПРОЦЕССОВ ГЕНЕРАЦИИ И ДЕТОКСИКАЦИИ ЛИПИДНЫХ ПЕРЕКИСЕЙ В НОРМАЛЬНОМ И ГИПЕРТРОФИРОВАННОМ СЕРДЦАХ

А. А. КУБАТИЕВ, С. В. АНДРЕЕВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет важную роль в механизмах клеточного повреждения [1—4]. Способность клеточных мембран подвергаться разрушительному действию продуктов липоперекисления обусловлена особенностями их химического строения и прежде всего присутствием в них фосфолипидов [2, 5]. Будучи сложными полифункциональными соединениями, фосфолипиды принимают активное участие в поддержании надмолекулярной организации биологических мембран и регуляции их метаболической деятельности. В последние годы было показано, что вследствие известной химической «слабости» фосфолипиды легко подвергаются окислительной деструкции молекулярным кислородом с нарушением гидрофобности липидной матрицы и последующим проникновением инициаторов свободно-радикального автоокисления во внутренние слои мембраны [5]. Этому в равной степени могут способствовать два фактора: либо «выталкивание» из фосфолипидов жирнокислотных ацилов и связанное с этим образованием лизофосфолипидов, либо непосредственное «разрыхление» гидрофобного барьера мембран полярными перекисными группировками, также находящимися в фосфолипидном окружении. Обладая высокой реакционной способностью, перекиси липидов вызывают дезинтеграцию внутриклеточных структур, окисление и полимеризацию низкомолекулярных внутриклеточных компонентов и макромолекул [3].

В обычных физиологических условиях процесс строго лимитирован, однако различные экстремальные и патологические воздействия, связанные с повреждением мембранных структур, приводят к интенсификации перекисления липидов [6, 7].

Последствиями химической модификации гидрофобного слоя фосфолипидных мембран являются блокада мембраносвязанных ферментных комплексов и повышение их неспецифической проницаемости для ионов и неэлектролитов. Подобная возможность, в частности, продемонстрирована недавно в опытах с фрагментами саркоплазматического ретикулула (СР) поперечнополосатых мышц кролика. Установлено, что накопление токсических продуктов ПОЛ вызывает резкое увеличение проницаемости мембраны СР для ионов Са, «разобщение» процессов транспорта Са<sup>2+</sup> и гидролиза АТФ, а также ингибирование Са-зависимой АТФ-азы [8]. Если учесть, что такие же изменения транспортной функции СР вызывают нарушение сократительной способности мышечной ткани [9], то возникает естественный вопрос: связаны ли эти нарушения с действием продуктов ПОЛ? Косвенный ответ на этот вопрос можно найти в работах Омае и соавт. [10], а также Zalkin и соавт. [11], изучавших процессы липоперекисления при генетически обусловленной мышечной дистрофии Дюшенна, а также дистрофии, вызванной Е-авитаминозом. Было установлено, что генерация липоперекисей в фосфолипидах СР дистрофических мышц действительно обусловлена качественными и количественными изменениями фосфолипидного состава, нарушениями структурированности и упорядоченности углеводородных цепей в гидрофобном липидном бислое мембраны.

В последние годы появились сообщения о связи ПОЛ с функцией сердечной мышцы [12—16]. Введение животным адреналина вызывало резкое повышение уровня липоперекисей в миокарде с развитием его некроза [12]. Аналогичные данные получены при моделировании эмоциогенных повреждений миокарда [13]. Установлено, что повышенный уровень липидных перекисей в миокарде при эмоциогенных расстройствах отражает усиление процессов их окисления.

Следует отметить, что сам по себе факт генерации продуктов липоперекисления в поврежденном миокарде действительно представляет существенный интерес. Однако неясно, как происходит эта генерация. Известно, что внутриклеточная концентрация липидных перекисей в каждый данный момент определяется равновесием двух сбалансированных процессов — генерации продуктов ПОЛ и их детоксикации. Последний может осуществляться как ферментативным, так и неферментативным путем [3]. При ферментативном разрушении гидроперекисей, происходящем по типу нуклеофильного замещения по кислороду, образуются однородные молекулярные продукты, являющиеся изомерами гидрокислот и разлагающиеся ферментами глутатионпероксидазой и каталазой [5]. В то же время под действием фермента супероксиддисмутазы происходит блокада супероксидного анионрадикала в стадии его образования. При другом, менее выгодном для организма, неферментативном механизме разложения гидроперекисей образуется большое количество взаимодействующих

друг с другом свободных радикалов, которые сами по себе могут атаковать функционально важные мишени в клетке и индуцировать новые цепи радикального окисления с высокими токсическими свойствами [5]. Из сказанного становится понятным, что механизмы генерации липидных перекисей в организме довольно сложны и не могут быть объективно оценены без параллельного исследования процессов их детоксикации.

Приступая к данной работе, мы поставили перед собой две основные задачи: 1) изучить соотношение процессов генерации и детоксикации липидных перекисей в нормальном сердце; 2) определить конкретный вклад каждого из этих процессов в окислительную деструкцию миокарда в динамике его гипертрофии.

В качестве объектов исследования были избраны микросомы и митохондрии сердца, в которых процессы ПОЛ протекают особенно интенсивно по сравнению с другими субклеточными структурами. Изучалась активность двух наиболее исследованных систем: ПОЛ-НАДФ·Н-зависимой (НЗП) и аскорбатзависимой (АЗП), а также уровень дневной конъюгации, общая антиокислительная способность миокарда и активность антиокислительной ферментной системы, в том числе супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на кроликах породы шиншилла массой 3—3,5 кг, содержащихся в виварии на обычном рационе питания. Для воспроизведения гипертрофии сердечной мышцы использовалась оригинальная методика тромбоза легочных сосудов, основанная на комплексном воздействии на свертывающую способность крови и иммунный гомеостаз [17].

Интактных кроликов подвергали воздействию микродоз тромбина в сочетании с атропином и на высоте подъема свертывающей потенции крови и понижении ее фибринолитических свойств вводили внутривенно специфические противолегочные иммуноглобулины. Уже через 3 ч после этого наблюдалось диффузное поражение микроциркуляторного русла легких кроликов с последующим нарастанием тромботических масс в течение 3—4 дней до средних и крупных ветвей легочных артерий. На 5—7-й день тромботический процесс охватывал до 70—80% всего бассейна легочных артерий и животные погибали при явлениях недостаточности правого сердца. Данная модель имела то преимущество, что, помимо высокой воспроизводимости и нетравматичности, давала возможность проследить за всеми этапами компенсаторного приспособления миокарда правого сердца, начиная от его гиперфункции и кончая развитием недостаточности. Степень тромбоза оценивалась в процентах по методу Boguach и соавт. [18]. О величине гипертрофии правого сердца судили по функциональным

(показатели внутрисердечной гемодинамики и фазовой структуры систолы правого желудочка сердца) и биохимическим (содержание пукленовых кислот) критериям, а также по нарастающую массы правого желудочка (в процентах) в динамике тромботической окклюзии легочных сосудов.

Все биохимические исследования проводили как на гомогенатах сердечной мышцы, так и на субклеточных структурах — микросомах и митохондриях. Для получения субклеточных фракций сердца кроликов, забитых под гексеналовым наркозом (3 мл 1% раствора внутривенно), перфузировали охлаждением 0,14 М NaCl, тщательно отмывали от крови, очищали от жировых и соединительнотканых элементов и гомогенизировали с 9 объемами 0,2 М сахарозы, 0,01 М трис-HCl с pH 7,4, и 0,2 мМ ЭДТА в стеклянном гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма. Ядра, мифрилы и перазрушенные клетки удаляли центрифугированием при 900 g в течение 10 мин. Митохондрии осаждали центрифугированием надосадочной жидкости в препаративной рефрижераторной ультрацентрифуге «Beckman» (США) при 8000 g в течение 10 мин. Полученный осадок промывали дважды в среде гомогенизации, затем ресуспендировали и использовали в качестве митохондриальной фракции. При повторном центрифугировании супернатанта митондрий при 105 000 g в течение 1 ч в той же среде получали микросомальную фракцию. Все операции по выделению субклеточных фракций после забоя кроликов проводили на холоду при 2—4° С. Чистоту выделенных препаратов микросом и митондрий проверяли по активности маркерных ферментов [1]. Об активности систем перекисного окисления мембранных фосфолипидов судили по кинетике накопления малонового диальдегида в процессе аэробной инкубации [3, 15].

При изучении НАДФ·Н-зависимого ПОД в микросомах и митондриях сердечной мышцы инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 1 мМ АТФ, 0,1 мМ FeCl<sub>3</sub>, 50 мМ трис-маленного буфера с pH 6,75, 0,5—1 мг микросомного белка и НАДФ·Н-генерирующую систему, включавшую 0,5 мМ НАДФ, 10 мМ глюкозо-6-фосфата и 1 мкг глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.

В контрольную пробу НАДФ·Н-генерирующую систему не вносили. Инкубацию проводили при 37° С в течение 20 мин при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 30% ТХУ и осадок удаляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. Из полученного супернатанта 100 мкл вносили в специальные микропробирки, добавляли туда же 20 мкл 0,6 N HCl, 80 мкл 0,12 М тиобарбитуровой кислоты и всю эту смесь помещали в водяную баню при 100° С на 10 мин. Интенсивность образующейся при этом окраски измеряли на спектрофотометре «Beckman» при 535 нм.

При исследовании аскорбатзависимого ПОД в состав инкубационной смеси входили 1 мМ АТФ, 0,1 мМ FeCl<sub>3</sub>, 50 мМ трис-маленного буфера с pH 6,75, 0,5—1 мг белкового препарата и

0,8 мМ аскорбиновой кислоты. Реакцию проводили так же, как и выше. В контрольную пробу вносили все компоненты среды, за исключением аскорбиновой кислоты. Уровень диеновой конъюгации определяли методом Placer [19], содержание эндогенных антиоксидантов — методом Glevind [20].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) исследовались модифицированным методом Mistrá и соавт. [21], основанным на принципе ингибирования автоокисления адреналина. Стандартные определения проводили в термостатирующей кювете при 25° С в 3 мл 0,05 М Na-карбонатного буфера с рН 10,2, содержащего  $10^{-4}$  ЭДТА. Реакционная смесь включала  $3 \cdot 10^{-4}$  М L-адреналина и  $10^{-5}$  М адrenoхрома. Реакцию инициировали введением 0,4 мл кислого раствора адреналина с рН 2,5 и регистрировали начальную скорость автоокисления адреналина, равную  $0,025 \text{ мин}^{-1}$ , по образованию адrenoхрома на спектрофотометре «Beckman» при 480 нм. За единицу активности СОД принимали такое ее количество, которое требуется для ингибирования начальной скорости автоокисления адреналина на 50% в описанных выше условиях.

Активность глутатионпероксидазы (ГП) исследовали при 25° С модифицированным методом Paglia и соавт. [22], каталазы — методом Bergmeyer [23]. Содержание белка определяли по Lowry [24], концентрацию нуклеиновых кислот — методом А. С. Спирина [25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные кинетические кривые перекисления полипеповых липидов в гомогенате, митохондриях и микросомах интактного сердца кролика, а также в печени приведены на рис. 117. Как видно, нормально функционирующее сердце по сравнению с печенью характеризуется очень низким стационарным уровнем липоперекисления: период индукции ПОЛ для миокарда почти вдвое длиннее, а уровень диеновой конъюгации и малонового диальдегида (МДА) гораздо ниже. В субклеточных фракциях миокарда интенсивность процессов ПОЛ несколько выше, чем в гомогенате, что объясняется, по-видимому, локализацией в них электронпереносящих транспортных цепей [1]. Сравнение интенсивности ПОЛ в различных субклеточных фракциях показывает, что в микросомах преобладает НЭП, тогда как в митохондриях — АЭП.

Почти во всех случаях пониженная способность интактной сердечной мышцы к генерации липидных перекисей сочеталась с высоким уровнем в ней жиро- и водорастворимых антиоксидантов, а также активности антиокислительной ферментной системы (рис. 118). В ряде случаев активность СОД и особенно ГП была настолько значительной, что практически не отличалась от активности их в печеночной ткани, которая, как известно, весьма богата этими ферментами.



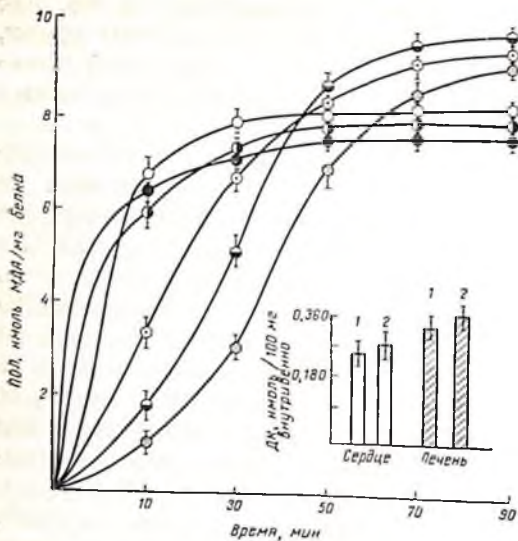


Рис. 117. Интенсивность перекисного окисления липидов и уровень диеновых конъюгатов в субклеточных структурах сердца и печени интактных кроликов.

а — ИЗП в микросомах сердца; б — ИЗП в митохондриях сердца; в — АЗП в митохондриях сердца; г — ИЗП в микросомах печени; д — ИЗП в митохондриях печени; е — АЗП в митохондриях печени; 1 — митохондрии; 2 — микросомы.

Поскольку сердце отличается высоким окислительным метаболизмом, есть все основания предполагать, что повышенный уровень антиокислительной ферментной системы в интактном миокарде отражает один из важных общебиологических механизмов защиты его от постоянно «атакующих» продуктов липоперекисления. Это предположение особенно наглядно проявлялось в опытах на тромбированных животных. Так, при 10% окклюзии легочных артерий на фоне достаточной сбалансированности гемодинамической деятельности правого желудочка и отсутствии признаков его гипертрофии (рис. 119) уровень липидных перекисей в митохондриях и микросомах практически не менялся

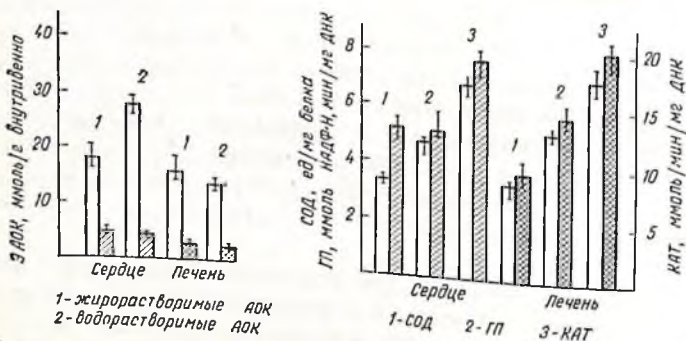


Рис. 118. Уровень эндогенных антиоксидантов и активность антиокислительных ферментов в субклеточных структурах сердца и печени интактных кроликов.

ЭАОК — эндогенные антиоксиданты; СОД — супероксиддисмутаза; ГП — глутатионпероксидаза; КАТ — каталаза. Светлые столбцы — митохондрии, заштрихованные — микросомы.

(табл. 36). Вместе с тем отмечалось повышение антиокислительной активности миокарда. Активность СОД в митохондриях возросла на 38%, ГП — примерно на 20%, каталазы — на 32% от исходного. В микросомах усиление активности антиокислительных ферментов было еще более существенным — соответственно на 53,46 и 58%.

Приведенные данные показывают, что компенсированные нагрузки на правый желудочек сердца, вызванные умеренным повышением легочного сосудистого сопротивления, приводят к активации антиокислительной способности миокарда, несмотря на отсутствие явных признаков гемодинамических расстройств и сохранность сократительной деятельности. Можно полагать, что активация механизмов, способствующих детоксикации липидных перекисей, связана, с одной стороны, с острой гипоксемией миокарда, обусловленной механическим отключением части легочного круга из кровообращения и недостаточной оксигенацией, поступающей в правый желудочек крови, с другой — возрастающей нагрузкой на правые отделы сердца.

При прогрессировании тромботического процесса с обтурацией примерно 30% сосудистого русла легких гемодинамическая нагрузка на миокард правого желудочка еще больше возрастает и для преодоления сопротивления оттекающей крови сократительная способность его усиливается более чем втрое. В этот период наряду с повышением внутрижелудочкового систолического давления отмечалось некоторое повышение уровня конечного диастолического давления, а также увеличение длительности периода изгипания. Степень гипертрофии миокарда соответствовала примерно 20—25% (см. рис. 119).

Наряду с появлением признаков перегрузки правого желудочка сердца наблюдалось усиление ПОЛ в субклеточных структурах миокарда (см. табл. 36). Уровень НЗП в микросомах миокарда повысился в среднем на 28%, в митохондриях — на 19%. В меньшей степени, хотя и достоверно, возрастал уровень АЗП: в микросомах — на 15%, в митохондриях — на 10%. Обращало на себя также внимание отчетливое повышение в митохондриях и микросомах содержания диеновых копъюгатов. Последнее сви-

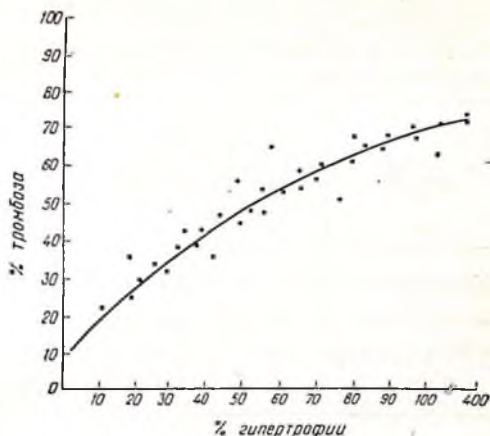


Рис. 119. Динамика развития гипертрофии правого желудочка сердца в процессе тромботической окклюзии легочных сосудов.

## УРОВЕНЬ ЛИПИДНЫХ ПЕРЕКИСЕЙ, ЭНДОГЕННЫХ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ АНТИАнтиОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ СЕРДЦА

Группа кроликов	Показатель					
	НЗП		АЗП		ДК	
	нмоль МДА мг белка		нмоль МДА мг белка		нмоль МДА мг белка	
	а	б	а	б	а	б
Контрольная	1,8±0,06	2,5±0,09	2,0±0,05	1,4±0,02	0,289±0,04	0,312±0,03
КГС без гипертрофии, %	+8 >0,05	+7 >0,05	+12 >0,05	+10 >0,05	+9 >0,05	+6 >0,5
Гипертрофия, %: 25—30	+19 <0,05	+28 <0,05	+10 >0,05	+15 >0,05	+26 <0,05	+41 <0,05
60—70	+128 <0,01	+164 <0,05	+155 <0,001	+99 <0,01	+150 <0,05	+90 <0,05
Свыше 70	+260 <0,001	+192 <0,001	+210 <0,001	+220 <0,001	+175 <0,01	+126 <0,001

Условные обозначения: НЗП — НАДФ-Н-зависимое ПОЛ; АЗП — сднанты; СОД — супероксиддисмутаза; ГП — глутатионпероксидаза; КАТ — катазоы.

детельствует о том, что ранние периоды компенсаторной гипертрофии миокарда сопровождаются повышенной аккумуляцией в нем не только конечных, но и начальных продуктов свободнорадикального автоокисления липидов.

Антиокислительная способность миокарда достигала у животных с 30% тромбозом легочных сосудов максимальных величин. Особенно значительным было увеличение ферментативной активности ГП (на 93%) и каталазы (на 80%) в микросомах. В митохондриях увеличение составило соответственно 76 и 59%.

Активность СОД в микросомах повысилась на 62%, в митохондриях — на 56%. Следовательно, несмотря на некоторое усиление процессов ПОЛ, клетки миокарда при начинающейся гипертрофии достаточно надежно обеспечены защитными «антиокислительными» ферментами. Они разрушают липидные перекиси наиболее выгодным для клетки путем, не приводящим к образованию свободных радикалов, способных индуцировать новые цепи радикального окисления, и поэтому могут рассматриваться как «антирадикальные» ферменты клетки.

ОКСИДАНТОВ И АКТИВНОСТЬ  
В ДИНАМИКЕ ЕГО ГИПЕРТРОФИИ

ЭАОК, ммоль влаж- ной массы		СОД, ед мг белка		ГП, ммоль НАДФ-Н в 1 мин мг ДНК		КАТ, ммоль мин на 1 мг ДНК	
а	б	а	б	а	б	а	б
18±1,6	26±2,3	3,4±0,6	4,6±0,5	4,09±0,62	4,4±0,56	15,3±4,1	18,4±3,9
+24 <0,05	+17 >0,05	+38 <0,05	+53 <0,01	+20 <0,05	+46 <0,01	+32 <0,05	+58 <0,01
-10 >0,05	-14 >0,05	+56 <0,01	+62 <0,01	+76 <0,05	+93 <0,001	+59 <0,05	+80 <0,01
-30 <0,01	-44 <0,05	+14 >0,05	+10 >0,05	+18 >0,05	+20 <0,05	+5 >0,1	+8 >0,5
-39 <0,01	-50 <0,01	-30 <0,05	-35 <0,05	-26 <0,05	-30 <0,05	-44 <0,01	-60 <0,01

аскорбатзависимое ПОЛ; ДК — дневные конъюгаты; ЭАОК — эндогенные антиок-  
лаза; КГС — компенсаторная гиперфункция сердца; а — митохондрии; б — микро-

Более выраженная степень тромботической окклюзии легоч-  
ных сосудов (в пределах 50—60% всего бассейна легочных арте-  
рий), сопровождавшаяся гипертрофией правого сердца до 70% от  
его первоначальной массы, характеризовалась дальнейшим усиле-  
нием интенсивности ПОЛ при ослаблении антиокислительной  
способности миокарда.

Активность НЗП в микросомах возросла на 164%, АЗП — на  
99%. В митохондриях активация НЗП и АЗП достигала соответ-  
ственно 128 и 156%. Уровень дневных конъюгатов в микросомах  
повышался на 90%, тогда как в митохондриях — более чем на  
150%. Такое обильное «наводнение» клеточных структур продук-  
тами ПОЛ оказалось возможным благодаря значительному ослаб-  
лению их антиокислительной потенции. Из табл. 36 видно, что  
уровень жирорастворимых антиоксидантов в микросомах умень-  
шился на 44%, а в митохондриях — на 30%.

Параллельное исследование антиокислительной ферментной  
системы показало, что активность ее при данной степени гиперт-  
рофии была резко снижена и практически не выходила за рамки

исходной. По-видимому, в условиях высокой гипертрофии сердца, вызванной существенным нарушением оттока крови из правого желудочка, генерация липидных перекисей настолько интенсивна, что не может компенсироваться механизмами ферментативной защиты.

Несбалансированность систем образования и эффективного разрушения продуктов липопереокисления создает условия, благоприятствующие свободно-радикальному автоокислению фосфолипидов в гипертрофированном миокарде и уменьшению тем самым его сократительной способности. Последнее проявилось замедлением скорости сокращения и расслабления правого желудочка, снижением индекса сократимости (почти на 30%), уменьшением интенсивности функционирующих структур и удлинением периода изгнания.

В терминальной стадии тромботического процесса, когда площадь окклюзии легочных сосудов доходила до 70—80% и выше, а степень гипертрофии правого желудочка — до 350% от начальной, функциональные возможности сердца практически исчерпывались и на фоне критического падения сократительной способности желудочка уровень липидных перекисей достигал максимума. Наиболее высокое содержание МДА, отражавшее образование конечных продуктов ПОЛ регистрировалось при этом в микросомах, инкубированных с НАДФ·Н. Аскорбиновая кислота увеличила выход МДА в микросомной фракции на 220%. В митохондриях количество МДА под влиянием НАДФ·Н и аскорбата повышалось соответственно на 260 и 210%.

При инкубации субклеточных структур в среде с аскорбиновой кислотой интенсивность накопления первичных продуктов липопереокисления по показателям диеновой конъюгации была почти такой же высокой. Внесение в реакционную смесь НАДФ·Н сопровождалось еще более ощутимым приростом диеновых конъюгатов.

Параллельное исследование антиокислительной ферментной системы показало, что генерация липидных перекисей на данном этапе гипертрофии сердца проходила на фоне значительной блокады СОД, активность которой составляла около 35% от исходной, и ГП, понизившейся почти на 70% по сравнению с нормальным уровнем. Активность каталазы была снижена на 40%.

Полученные данные показывают, что уровень липидных перекисей в гипертрофированном миокарде возрастает за счет падения как концентрации эндогенных антиоксидантов, так и активности антиокислительных ферментов. В отличие от гипертрофированного сердца клетки нормального миокарда достаточно защищены от избыточного накопления продуктов липопереокисления. Последнее обеспечивается наличием в них эффективных внутриклеточных механизмов инактивации липидных перекисей, срабатывающих в стадии образования активных форм кислорода, а также в период их усиленной генерации. Высокий динамизм и

подвижность антиокислительной защитной системы сердца позволяют рассматривать ее в качестве своеобразной «буферной» системы, обеспечивающей стабильность и сохранность внутриклеточного гомеостаза. Нарушение «буферных» свойств этой системы приводит к тому, что клетки миокарда перестают «справляться» с окислительной свободно-радикальной атакой и в них начинают накапливаться продукты окислительной деградации липидов. Подобный механизм лежит, по-видимому, и в основе генерации липидных перекисей при развитии гипертрофии сердца.

Опыты показывают, что при высокой активности антиокислительной ферментной системы клетки миокарда в условиях компенсаторной гиперфункции хорошо справляются с повышенной нагрузкой. Однако по мере подавления «буферных» свойств антиокислительной системы интенсивность ПОЛ возрастает и в связи с дестабилизацией внутриклеточных мембран способность миокарда противостоять растущему сопротивлению крови резко уменьшается; сократимость миокарда постепенно падает, и развивается картина сердечной недостаточности. По-видимому, не последнюю роль играет и то обстоятельство, что, помимо повреждения клеточных мембран, продукты липоперекисления вызывают разобщение окислительного фосфорилирования и набухание митохондрий [26]. Это еще больше ухудшает судьбу гипертрофированной мышцы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1976.
2. Бурлакова Е. Б. Исследование физико-химических свойств липидов при некоторых патологических состояниях. — М., 1970.
3. Владимирцов Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972.
4. Чернух А. М. Воспаление (черки патологии и экспериментальной терапии). — М.: Медицина, 1979.
5. Козлов Ю. П., Каган В. Е., Ситковский М. В., Данилов В. С. Свободно-радикальное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Изд. МГУ, 1972.
6. Кубатиев А. А., Андреев С. В. Перекиси липидов и тромбоз. — Бюлл. exper. биол., 1979, 5, 214—217.
7. Hochstein P., Ernster L. Microsomal peroxidation of lipids and its possible role in cellular injury.—In: Ciba Foundation Symposium on cellular injury. London, 1964, p. 123.
8. Архипенко Ю. В. Повреждение саркоплазматического ретикулума скелетных мышц при ишемии: роль перекисного окисления липидов. — Бюлл. exper. биол., 1977, 6, 683—686.
9. Чазов Е. П., Смирнов В. Н. и др. Молекулярные механизмы сердечной недостаточности при ишемии миокарда. — Кардиология, 1976, 4, 5—13.
10. Omaye S. T., Tappel A. L. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and thiobarbituric acid-reactive products in muscles of chickens and mice with genetic muscular dystrophy.—Life Sci., 1974, 15, 137—145.
11. Zalkin H., Tappel A. L., Caldwell K. A. et al. Increased lysosomal enzymes in muscular dystrophy of vitamin E deficient rabbits.—J. biol. Chem., 1962, 237, 2678—2682.

12. *Kogan A. X.* Корреляционная взаимосвязь между интенсивностью свободно-радикального перекисного окисления липидов и степенью повреждения миокарда при развитии коронароокклюзионного инфаркта. — В кн.: Новое в диагностике и лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы. М., 1976, с. 75—77.
13. *Meerson F. Z., Gibber L. M., Markovskaya G. H. и др.* Профилактика нарушений сократительной функции сердца и язвенных поражений желудка при эмоциональном стрессе с помощью оксибутирата натрия и витамина Е. — Докл. АН СССР, 1977, 237, 5, 1230—1233.
14. *George C., Balasubramanian A., Cherian G.* Lipid peroxidation in rat heart effect of feeding coconut and sunflower seed oil.—J. Mol. cell. Cardiol., 1978, 10, Suppl. 1, 26.
15. *Takeshige K., Minekami S.* Reduced nicotinamide adenine denucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation by beef heart submitochondrial particles.—J. Biochem., 1975, 77, 5, 1067—1073.
16. *Myears C. E., McGuire W. P., Liss R. H. et al.* Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response.—Science, 1977, 197, 4299, 165—167.
17. *Андреев С. В., Кубатова А. А., Симакова Р. А.* Способ моделирования тромбоза легочных сосудов. — Бюлл. изобр. и открытий, 1977, 12, 144.
18. *Boruech K. D., Chakravati R. N., Wahi P. L.* Evaluation of xantinol nicotinate (complamine) in experimental pulmonary fibrin thromboembolism.—Ind. J. Med. Res., 1974, 62, 923—929.
19. *Placer Z., Johnson B., Cushman L.* Estimation of product of lipid peroxidation in biochemical system.—Analyt. Biochem., 1966, 16, 359—364.
20. *Glevind G.* Antioxidants in animal tissue.—Acta chem. scand., 1963, 17, 6, 1635—1640.
21. *Misra H. P., Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.—J. biol. Chem., 1967, 247, 10, 3170—3175.
22. *Paqlia D., Valentine W.* Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.—J. Lab. clin. Med., 1967, 70, 158—169.
23. *Bergmeyer H. U.* Methods of Enzymatic Analysis.—N. Y. Acad. Press, 1965, 837—886.
24. *Lowry O. H., Rosebrough N. S., Farr A. L., Randall T.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.—J. biol. Chem., 1951, 193, 265.
25. *Спирип А. С.* Спектрофотометрическое определение суммарного количества пукленовых кислот. — Биохимия, 1958, 23, 656—662.
26. *Кондрашева И. М., Миронова Г. Д.* Необходимость кислорода для фосфорилирования АДФ в условиях цитанидного блока. — Биохимия, 1971, 4, 864—866.

УДК 612.173.1.015.348-06:612.398.192

**АМИНОКИСЛОТЫ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ БОКОВОЙ ЦЕПЬЮ  
И РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА БЕЛКА  
В СЕРДЦЕ КРЫСЫ**

Б. ЧУА (B. CHUA), Д. Л. ШЕЛ (D. L. SHEN),  
Е. О. ФУЛЛЕР (E. O. FULLER), Х. Е. МОРГАН (H. E. MORGAN) (США)

**ВВЕДЕНИЕ**

На белковый обмен в сердечной и скелетной мышцах влияет наличие аминокислот, особенно тех из них, которые имеют разветвленную боковую цепь. В результате стимуляции инициации пептидной белковый синтез ускорялся в крысиных сердцах, перфузированных буфером, содержащим пятикратные по сравнению с плазмой уровни аминокислот [1, 2]. Было обнаружено, что этот эффект зависит от повышенной доступности разветвленных аминокислот [3]. Так как перфузируемые крысые сердца могут окислять разветвленные аминокислоты [4] и различные некарбогидратные субстраты (лактат, ацетоацетат,  $\beta$ -оксипутират, пальмитат и олеат), увеличивавшие белковый синтез в одинаковой степени [3], предполагалось, что ускорение синтеза белка должно быть связано с их окислением. Было также обнаружено, что разветвленные аминокислоты ускоряют белковый синтез и замедляют деградацию белка в диафрагме крысы [5—7]. Эти эффекты были отнесены либо к действию лейцина или смеси изолейцина и валина [5], либо исключительно к влиянию лейцина [6, 7]. В диафрагме введение метаболитов обмена разветвленных аминокислот не оказывало ингибирующего действия [7]. Было обнаружено, что смесь трех разветвленных аминокислот или один лейцин также увеличивали белковый синтез и ингибировали протеолиз в скелетных мышцах, содержащихся в препаратах перфузируемой части туловища [8]. Зависимость этих эффектов от наличия субстрата энергетического метаболизма считалась маловероятной потому, что введение глюкозы и пальмитата не имитировало названных эффектов.



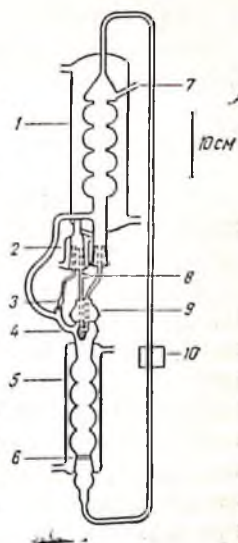
Для того чтобы выяснить роль разветвленных аминокислот в регуляции синтеза и распада белка, сердца перфузировались буфером, содержащим глюкозу или смеси глюкозы и разветвленных аминокислот, или их метаболитов. Были поставлены эксперименты для того, чтобы определить: 1) является ли лейцин уникальным среди разветвленных аминокислот по отношению к стимуляции синтеза и ингибированию деградации белка; 2) может ли этот эффект быть вызван метаболитами обмена разветвленных аминокислот; 3) влияет ли лейцин на синтез и деградацию белка при работе сердца.

## МЕТОДЫ

### Перфузионная установка

Установка для работающих сердец, описанная ранее [9, 10], была модифицирована с тем, чтобы уменьшить циркулирующий объем и улучшить оксигенацию буфера, содержащего альбумин (рис. 120). Установка состояла из шести основных частей: 1) часть с канюлями; 2) камера уравнивания давления в аорте; 3) комбинированный оксигенатор и сосуд для левого предсердия; 4) камера для сердца; 5) резервуар для буфера и фильтр; 6) перистальтический насос. Часть с канюлями для прикрепления аорты и левого предсердия, а также камера уравнивания давления в аорте были такими же, как описано ранее [10]. Оттекающая жидкость из камеры, уравнивающей давление, возвращалась в резервуар для буфера через отрезок трубки из тигона с подкожной иглой, вставленной в ее дистальный конец. Игла с внутренним диаметром 0,58 мм обеспечивала достаточное сопротивление, что давало систолическое и диастолическое давление около 145 и 75 мм рт. ст.; использование иглы с внутренним диаметром 0,33 мм обеспечивало давление около 160/100 мм рт. ст. Оксигенатор и камера для левого предсердия были взяты из установки, описанной Nems и соавт. [11] для перфузии печени. Перфузат входил в верхнюю часть оксигенатора и растекался в виде пленки по его внутренней поверхности, состоящей из ряда стеклянных сфер. Нижняя часть оксигенатора закапчивалась суженным стеклянной трубкой, которая соединялась с тефлоновой пробкой, в которую вставлен кусок трубки из нержавеющей стали (внутренний диаметр 2,8 мм). Короткий отрезок тигоновой трубки (внутренний диаметр 3,2 мм) соединял эту стальную трубку с канюлей, присоединенной к предсердию. Боковой отросток, расположенный в нижней части оксигенатора, служил для оттока избытка буфера в резервуар. Высота оттекающей избыточной жидкости над уровнем левого желудочка определяла давление (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>), насыщенная водяными парами, входила в оксигенатор через верхний боковой отросток и выходила в емкость

Рис. 120. Модифицированная установка для перфузии работающих сердец крысы. Детали установки описаны в тексте. Напряжение кислорода в буфере, выходящем из оксигенатора, составляло в среднем  $623 \pm 10$  и  $603 \pm 21$  мм рт. ст. (4 измерения для каждой величины), когда в тракт, отходящий из аорты, были вставлены иглы внутренним диаметром 0,58 и 0,33 мм соответственно. В этих же самых сердцах напряжение кислорода в коронарном эфлюенте, полученном из легочной артерии, составляло в среднем  $210 \pm 9$  и  $284 \pm 14$  мм рт. ст. для игл диаметром 0,58 и 0,33 мм соответственно. Когда сопротивление для оттекающей жидкости создавалось иглой диаметром 0,58 мм, аортальное давление, частота сокращений, поток через аорту и коронарный ток сердца, перфузируемых буфером, содержащим 15 мМ глюкозу в качестве субстрата, были устойчивы в течение 90 мин. Систолическое давление поддерживалось на уровне примерно 145 мм рт. ст. в первые 90 мин и составило 90% от этой величины после 120 мин. Диастолические давления составляли в среднем примерно 77 мм рт. ст. и были устойчивы в течение двухчасового периода. Поток, выходящий через аорту, и коронарный поток составляли в среднем 42 и 27 мл/мин соответственно. Когда сопротивление



Когда сопротивление выходящему потоку создавалось иглой 0,33 мм, механическая производительность была не так стабильна во времени, как с иглой диаметром 0,58 мм. Систолическое давление составляло в среднем примерно 160 мм рт. ст. первые 60 мин, но в конце двухчасовой перфузии систолическое давление было одинаково, независимо от того, игла какого диаметра создавала сопротивление оттекающей жидкости. При использовании иглы внутренним диаметром 0,33 мм диастолическое давление было примерно 100 мм рт. ст. Большие сопротивления в тракте оттока из аорты привели к перераспределению потоков, выходящих из сердца, от аортального в пользу коронарного. Аортальный поток (приблизительно 10 мл/мин) был устойчив в течение двухчасового периода, а коронарный поток падал примерно от 35 мл/мин в течение 2 ч.

1 — оксигенатор — предсердный резервуар; 2 — камера для уравнивания давления; 3 — игла; 4 — камера для сердца; 5 — буферный резервуар; 6 — фильтр; 7 — вход для газа; 8 — вход для предварительной перфузии; 9 — держатель каплеоль; 10 — насос.

с буфером через отросток для оттока избыточной жидкости. Деталь с каплюлями вставлялась в камеру для сердца, которая находилась в верхней части емкости для буфера. Кроме того, камера для сердца имела Y-образный отросток, куда поступали избыток для сердца из оксигенатора и оттекающая жидкость из камеры уравнивания давления. Емкость для буфера представляла собой обратный холодильник (длина 20 см) с вделанным в нижнюю часть крупнопористым стеклянным фильтром. Рециркуляция перфузата осуществлялась с помощью перистальтического насоса («Cole Palmer Co.», модель 7545; головка насоса № 7014) со скоростью 120 мл/мин. Температура воды, циркулирующей через термостатирующие рубашки установки, поддерживалась равной  $37^\circ \text{C}$ . Минимальный объем циркулирующей жидкости был 40 мл вместо 65 мл в предыдущих установках [10]; буфер, содержащий альбумин, мог оксигенироваться без образования пены. Эксплуа-

тация установки осуществлялась способом, описанным ранее [10]. Препараты по Лангендорфу перфузировались при гидростатическом давлении 60 мм рт. ст., как описано ранее [10].

## Метод перфузии

Во всех экспериментах использовали модифицированный бикарбонатный буфер Кребса — Хензеляйта, рН 7,4. Конечные концентрации компонентов буфера были 117 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 мМ ЭДТА, 24,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 15 мМ глюкозы. Концентрации аминокислот соответствовали их нормальным концентрациям в плазме крови [1]. Перед добавлением к буферу аминокислоты растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и рН доводили до 7,4. В некоторых экспериментах точный объем циркулирующего буфера определяется методом изотопного разбавления с применением D-[<sup>3</sup>H]-сорбитола. В тех экспериментах, при которых измерялась скорость деградации белков, рециркуляции буфера, содержащего 0,01 мМ фенилаланин, различные смеси аминокислот и 0,02 мМ циклогексимид, предшествовала предварительная перфузия в течение 10 мин. При измерении скоростей белкового синтеза в перфузат добавляли <sup>14</sup>C-фенилаланин (550 имп/мин на 11 имоль) в концентрации 0,4 мМ. При этой концентрации удельные радиоактивности фенилаланил-γ-РНК и фенилаланина в перфузате были равны [12]. В конце перфузии сердца срезали с канюли и помещали в стаканы с 0,15 М NaCl (2° С), вскрывали, промакивали фильтровальной бумагой и помещали в предварительно взвешенные пробирки с 5% трихлоруксусной кислотой. Сердца удаляли у крыс породы «Спрейг-Доули» (230—300 г), которые голодали в течение ночи и которых анестезировали нембуталом. Сердца прикрепляли к канюлям, как описано ранее [10]. Давление в аорте и желудочках записывали на светочувствительной бумаге («Honeywell Visicorder», модель 1508 С). Поток через аорту работающего сердца представлял собой поток, выходящий из камеры уравнивания давления; коронарный ток оценивали путем измерения объема жидкости, которую вставляли канюлю и часть оттекающей жидкости пропускали через термостатируемую (37° С) ячейку из люцита, снабженную кислородным электродом Кларка.

## Определение включения фенилаланина, поглощения и внутриклеточной концентрации аминокислот

Включение [<sup>14</sup>C]-фенилаланина в белок целых сердец определяли так, как описано ранее [1]. Двойные пробы по 4—8 мг белка растворяли в 1 мл солибиллизатора тканей (NCS, Amer-

sham/Searle) при 50° С в течение часа и к ним добавляли 10 мк-сцинтиллятора («Formula» 949, «New England Nuclear»). Радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-350 фирмы «Beckman», для введения поправки на гашение использовали [<sup>14</sup>C]-толуол («New England Nuclear»).

При измерении поглощения разветвленных аминокислот через сердца в течение часа рециркулировали буферы, содержавшие фенилаланин (0,01 мМ), нормальные по сравнению с плазмой уровни других аминокислот и либо: а) 15 мМ глюкозу и 0,2 бычий сывороточный альбумин; б) 2 мМ лактат, 10 мМ глюкозу, 400 мкЕД инсулина на 1 мл и 0,2% бычий сывороточный альбумин; в) 1,5 мМ пальмитат, 10 мМ DE-β-оксепутират, 8 мМ глюкозу и 4% бычий сывороточный альбумин. Уровни разветвленных аминокислот измеряли на аминокислотном анализаторе фирмы «Beckman» 119. В качестве внутреннего стандарта добавляли лейциналанин. При измерении поглощения лейцина через сердца рециркулировался в течение 2 ч буфер, содержащий глюкозу (15 мМ), фенилаланин (0,01 мМ), лейцин (0,5; 1, 2 или 5 мМ), 0,02 мМ циклогексимид и нормальные по отношению к плазме уровни других аминокислот (за исключением изолейцина и валина). Концентрацию лейцина измеряли либо на аминокислотном анализаторе, либо по связыванию с ТРНК [13, 14]. Величины поглощения вычисляли по уменьшению содержания аминокислот в перфузате. Результаты представлены как функция средней концентрации аминокислот в течение времени, за которое измерялось поглощение аминокислот. Внутриклеточную концентрацию аминокислот (нмоль/мл) вычисляли по формуле:

$$[\text{Внутриклеточная аминокислота}] = \frac{A/\kappa \text{ в сердце (нмоль/г)} - \text{сорбитоловое пространство (мл/г)} \cdot A/\kappa \text{ в перфузате (нмоль/мл)}}{\text{Общая вода (мл/г)} - \text{сорбитоловое пространство (мл/г)}}$$

Содержание лейцина в сердце измеряли в трихлоруксусных экстрактах по связыванию ТРНК или на аминокислотном анализаторе. Перед измерением концентрации лейцина трихлоруксусные экстракты обрабатывали поносвязывающей смолой (АС11АS, «Bio-Rad Laboratories» 0,25 г смолы на 1 мл экстракта). Пространство, пронизываемое для сорбитола, определяли, как описано ранее с помощью D-[1-<sup>3</sup>H] сорбитола [1]. Общее содержание воды было принято равным 0,8 мл/г [1].

### Перфузия сердец при измерениях превращения <sup>14</sup>C аминокислот до <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

При измерении образования <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> из радиоактивного лейцина и изолейцина сердца перфузировали в течение 30 мин без рециркуляции буфера. В буфер добавляли глюкозу (15 мМ), фенилаланин (0,01 мМ) и нормальные по отношению к плазме уровни других аминокислот, за исключением разветвленных сое-

динений. Промывочную перфузию продолжали тем же буфером, содержащим  $2 \cdot 10^{-5}$  М циклогексимида и радиоактивный лейцин или изолейцин. Коронарный эфлюент собирали через 1 мин из легочной артерии в пробирки, содержавшие по 3 мл парафинового масла. Аликвоту коронарного эфлюента (1 мл) вносили в колбы, содержавшие 0,2 мл  $5\text{NH}_2\text{SO}_4$  и подвешивали в сосудик, в который была помещена свернутая фильтровальная бумага, смоченная 1 М окисью метилбензетония (0,2 мл). После встряхивания в течение часа при  $25^\circ\text{C}$  сосудик с бумагой помещали во флакон со сцинтиллятором («Formula» 949, «New England Nuclear») и измеряли радиоактивность. Скорости образования  $^{14}\text{CO}_2$  вычисляли с использованием удельной радиоактивности лейцина в перфузате.

### Статистический анализ

Достоверность различий между значениями определяли по критерию Стьюдента. Величины выражали на 1 г сырого сердца.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Поглощение, внутриклеточные концентрации разветвленных аминокислот и образование $^{14}\text{CO}_2$

Первые серии экспериментов были предприняты для того, чтобы найти условия для измерения скоростей превращения  $[\text{U} - ^{14}\text{C}]$ -лейцина и  $[\text{U} - ^{14}\text{C}]$ -изолейцина до  $^{14}\text{CO}_2$ , измерить скорости поглощения лейцина и его окисления в широком диапазоне концентраций лейцина в перфузате и определить вклад лейцина как субстрата в окислительный метаболизм. Было обнаружено, что после 6 мин инкубации с  $^{14}\text{C}$ -лейцином образование  $^{14}\text{CO}_2$  достигало постоянной величины, которая вместе с удельной радиоактивностью лейцина в перфузате использовалась для вычисления скоростей его превращения до  $^{14}\text{CO}_2$ . Для проверки правильности использования удельной активности лейцина в перфузате при вычислении скоростей удельные радиоактивности лейцина были измерены в перфузате и внутриклеточной воде. После 8 мин экспозиции с  $^{14}\text{C}$ -лейцином удельные активности лейцина во внутриклеточной воде и перфузате были определены на основании измерений содержания и удельной активности лейцина в хлорокислотных экстрактах сердца и перфузата, пространства, пронизываемого для сорбита, и общего содержания воды [2]. В экстрактах поокислотного анализатора, приходилось на колонку аминокислотной концентрации в перфузате 0,1 и 0,5 мМ соответственно. Удельные активности лейцина рассчитывали с использованием величины радиоактивности в лейциновом пике. При 0,1 мМ концентрации лейцина в перфузате удельная активность внутриклеточного лейцина составляла  $73 \pm 3\%$  (4 измерения) удельной

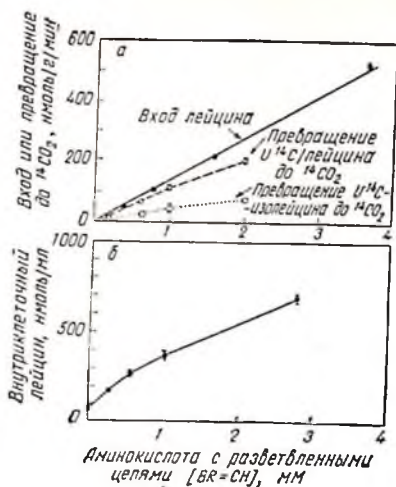


Рис. 121. Влияние концентрации [U-<sup>14</sup>C]-лейцина и [U-<sup>14</sup>C]-изолейцина в перфузате на их поглощение (а), внутриклеточную концентрацию (б) и превращение до <sup>14</sup>СО<sub>2</sub> сердца перфузировавшихся так, как это описано в разделе «Экспериментальные методы». Между 6-й и 10-й минутой перфузии буфером, содержащим либо 0,1 мМ [U-<sup>14</sup>C]-лейцин, либо [U-<sup>14</sup>C]-изолейцин, коронарный эфлюент из легочной артерии был отобран и проанализирован на содержание <sup>14</sup>СО<sub>2</sub> (а). Прежде чем перфузию переключали на буфер, содержащий следующую более высокую концентрацию лейцина или изолейцина, сердца перфузировали 15 мин буфером без аминокислот с разветвленной цепью. Общее время перфузии для каждого сердца было равно 115 мин. Для измерения превращения [U-<sup>14</sup>C]-лейцина или [U-<sup>14</sup>C]-изолейцина до <sup>14</sup>СО<sub>2</sub> перфузировали три или четыре сердца, соответственно. В каждом случае буфер содержал 145 200 имп/мин/мл перфузата. При измерении поглощения лейцина перфузировали по пять сердец для каждой концентрации лейцина. Соотношение между величиной поглощения лейцина и его концентрацией в перфузате описывалось следующей формулой:  $y = 149x - 12,2$ . Величины представляли собой среднее  $\pm$  стандартная ошибка.

активности в перфузате. Ранее Buse и соавт. [4] обнаружили, что удельная активность внутриклеточного лейцина была равна приблизительно 60% активности лейцина в перфузате при этой концентрации. При концентрации в перфузате 0,5 мМ эти величины были одинаковы. Аналогичные соотношения между удельными активностями внутриклеточного и внеклеточного фенилаланина были описаны ранее при перфузии крысиного сердца [12]. Эти факты показывают, что скорость превращения до СО<sub>2</sub> была занижена приблизительно на 25% при концентрации лейцина 0,1 мМ, когда пользовались удельной активностью перфузата вместо активности внутриклеточного лейцина, и что величины были одинаковы, когда концентрация в перфузате 0,5 мМ и выше. Поглощение лейцина из перфузата линейно увеличивалось по мере роста его концентрации до 3,7 мМ (рис. 121). При концентрации 1 мМ скорость поглощения была равна 137 нмоль/г в ми-

пути. Для сравнения скорость превращения  $[U-^{14}C]$ -лейцина до  $CO_2$  составляла  $118 \pm 13$  нмоль/г в минуту и, таким образом, в этом случае 85% поглощенного лейцина декарбоксилировались и превращались в интермедиаты цикла трикарбоновых кислот. При 2 мМ концентрации лейцина скорость превращения  $[U-^{14}C]$ -лейцина до  $^{14}CO_2$  207 нмоль/г в минуту составляла 72% скорости поглощения. Превращение  $[U-^{14}C]$ -изолейцина до  $^{14}CO_2$  происходило со скоростью, составляющей около 40% скорости, наблюдаемой с лейцином. Внутриклеточная концентрация лейцина увеличивалась линейно по мере возрастания его количества в перфузате от 0,04 до 2,5 мМ (см. рис. 121, б). При более высоких концентрациях увеличение внутриклеточных уровней лейцина не было пропорционально повышению его внеклеточной концентрации.

Хотя сердце было способно превращать  $[U-^{14}C]$ -лейцин до  $^{14}CO_2$  с высокой скоростью, при высоких его концентрациях в перфузате и когда глюкоза была единственным окисляемым субстратом, скорости поглощения были намного меньше при нормальных по отношению к плазме уровнях разветвленных аминокислот

ТАБЛИЦА 37

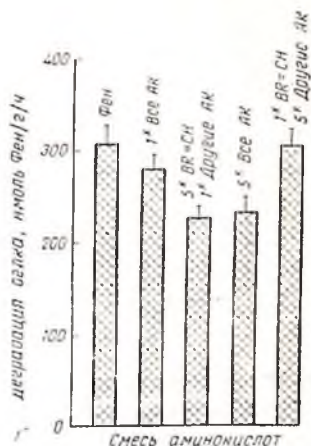
ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТОВ НА ПОГЛОЩЕНИЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ

Аминокислота с разветвленной цепью в перфузате, нмоль/мл	Препарат Лангендорфа		Работающие сердца	
	поглощение, нмоль/г в минуту	внутриклеточная концентрация, нмоль/мл	поглощение, нмоль/г в минуту	внутриклеточная концентрация, нмоль/мл
15 мМ глюкоза				
Лейцин, 183	$31 \pm 3$	$75 \pm 11$	$40 \pm 7$	—
Изолейцин, 118	$21 \pm 2$	$15 \pm 7$	$23 \pm 4$	—
Валин, 204	$20 \pm 1$	$86 \pm 13$	—	—
2 мМ лактат, 10 мМ глюкоза, 400 мкЕ инсулина/мл				
Лейцин, 183	$8,9 \pm 1,1^{**}$	$154 \pm 9^{**}$	$15 \pm 1^{**}$	$89 \pm 8^{**}$
Изолейцин, 118	$3,7 \pm 0,5^{**}$	$65 \pm 7^{**}$	$6,0 \pm 0,5^{**}$	$25 \pm 5^{**}$
Валин, 204	$2,2 \pm 0,4^{**}$	$58 \pm 16$	—	—
1,5 мМ пальмитат, 10 мМ DL-β-оксипутират, 8 мМ глюкоза				
Лейцин, 183	$14 \pm 3^{**}$	$193 \pm 4^{**}$	$24 \pm 1^{**}$	$125 \pm 16^{**}$
Изолейцин, 118	$7 \pm 2^{**}$	$102 \pm 7^{**}$	$11 \pm 1^{**}$	$68 \pm 5^{**}$
Валин, 204	$? \pm 4^{**}$	$74 \pm 8$	$12 \pm 1$	$46 \pm 3^{**}$

Сердца перфузировали в течение 1 ч буфером, содержащим 0,01 мМ фенилаланин, нормальные по отношению к плазменным уровням аминокислот и приведенные вставленной в тракт оттока их аорты. Величины представляют собой среднее  $\pm$  стандартная ошибка для 4—6 сердец.

\*  $p < 0,05$  против препаратов Лангендорфа, перфузируемых тем же субстратом.  
 \*\*  $p < 0,05$  против тех же препаратов, перфузируемых 15 мМ глюкозой; — не определялось.

Рис. 122. Влияние аминокислот на деградацию белка. После 10 мин предварительной перфузии буфером, содержащим 15 мМ глюкозу, 0,01 мМ фенилаланин и 0,02 мМ циклогексимид, сердца перфузировали в течение 2 ч тем же буфером, включавшим различные аминокислотные смеси. Приведенные величины представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка для 6—10 сердец.



и в присутствии смеси субстратов, окисляемых сердцем в норме (табл. 37). При перфузии буфером, содержащим только глюкозу, как в препаратах Лангендорфа, так и в работающих сердцах поглощение лейцина было приблизительно равно 35 нмоль/г в минуту. Поглощение уменьшалось в еще большей степени, когда сердца перфузировались смесями либо лактата, глюкозы и нисулина, либо пальмитата,  $\beta$ -оксипутирата и глюкозы. В присутствии любой субстратной смеси работа сердца увеличивала скорость поглощения лейцина. Поглощение изолейцина и валина было ниже, чем поглощение лейцина, и зависело аналогичным образом от добавления субстратных смесей. Внутриклеточная концентрация лейцина и изолейцина увеличивалась при добавлении любой из субстратных смесей и во всех случаях, за исключением одного, уменьшалась при работе сердца. В препаратах Лангендорфа внутриклеточное содержание валина не увеличивалось при добавлении субстратных смесей, но уменьшалось при работе сердца. Эти наблюдения показывают, что поступление разветвленных аминокислот извне клетки приносит незначительный вклад в окислительный метаболизм сердец, питаемых физиологическими смесями субстратов. Как установлено, работа сердца увеличивает скорость окисления, на что указывает увеличение их поглощения сердцем и снижение их внутриклеточных концентраций.

### Влияние аминокислот на деградацию белка

Скорости деградации белков измеряли по освобождению фенилаланина из сердец, перфузируемых буфером с циклогексимидом. При всех исследованных скоростях деградации освобождение этой аминокислоты было линейным в течение 2 ч. Так как фенилаланин не накапливается внутри клетки в условиях этих экспериментов [15], появление его в перфузате было истинным показателем деградации белка. В сердцах, перфузируемых буфе-



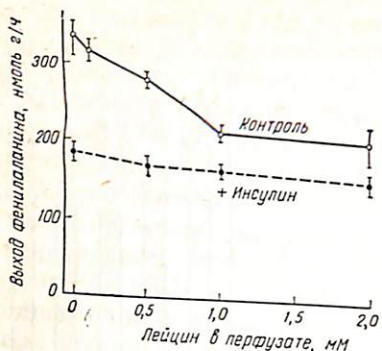


Рис. 123. Влияние лейцина и инсулина на деградацию белка. Сердца перфузировали буфером, содержащим 15 мМ глюкозу, 0,01 мМ фенилаланин, нормальные по сравнению с плазмой уровни аминокислот, за исключением соединений с разветвленной цепью, и 0,02 мМ циклогексимида. Лейцин и инсулин (25 МЕ/мл) присутствовали там, где это указано. При каждом условии перфузировали от 5 до 15 сердец. Величины представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

ром, содержащим только глюкозу и фенилаланин, деградация белка протекала наиболее быстро (рис. 122). Эта скорость уменьшалась на 25% добавлением либо пятикратных по сравнению с нормальным уровнем в плазме всех аминокислот или пятикратных уровне разветвленных соединений вместе с нормальными уровнями других аминокислот. Когда аминокислоты с разветвленной цепью не были включены в смесь аминокислот, при пятикратных уровнях в плазме, скорость деградации была идентичной только глюкозой и фенилаланином. Эти факты предполагают, что добавление разветвленных аминокислот может ингибировать разрушение белка. Предыдущие исследования показывают, что эти соединения стимулируют синтез белка [3].

### Влияние разветвленных аминокислот и их метаболитов на деградацию белка

В сердцах, перфузируемых в отсутствие инсулина, лейцин (1 или 2 мМ) ингибировал разрушение белка приблизительно на 40% (рис. 123, 124). Аналогичные эффекты не наблюдались при добавлении в перфузат либо изолейцина, либо валина (1 или 2 мМ). Концентрации лейцина, большие чем 1 мМ (приблизительно пятикратный нормальный уровень в плазме), максимально ингибировали скорость деградации в отсутствие гормона. С другой стороны, лейцин был неэффективен в присутствии инсулина (см. рис. 123), который значительно снижал скорости деградации при всех концентрациях лейцина.

Так как сердце окисляло разветвленные аминокислоты, в перфузат были добавлены метаболиты обмена этих соединений с целью выяснить, играет ли лейцин уникальную роль в регуляции деградации белка (рис. 125—127, а также см. рис. 124). Добавленные в тех же концентрациях, что и лейцин, продукты его трансаминирования и валина —  $\alpha$ -кетонизокапроат (см. рис. 124) и  $\alpha$ -кетонизовалерат (см. рис. 126) — ингибировали протеолиз. Введение  $\alpha$ -кетонизокапроата увеличивало внутриклеточную

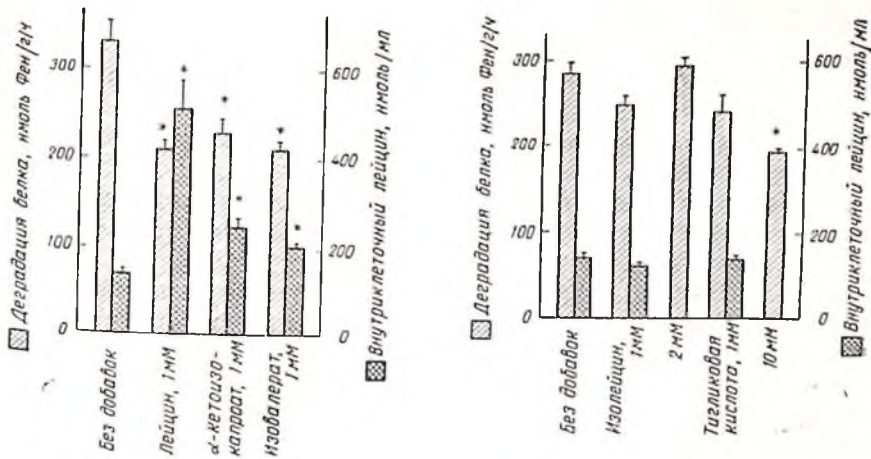


Рис. 124. Влияние лейцина и его метаболитов на протеолиз и внутриклеточное содержание лейцина. Сердца перфузировали так, как описано в подписи к рис. 123. Внутриклеточный лейцин определяли способом, описанным в разделе «Методы». Приведенные величины представляют собой среднее  $\pm$  стандартная ошибка для 6—10 сердец.

Рис. 125. Эффект изолейцина и его метаболитов на протеолиз и внутриклеточную концентрацию лейцина. Сердца перфузировали так, как описано в подписи к рис. 123. Приведенные величины представляют собой среднее  $\pm$  стандартная ошибка для 6—10 сердец. Звездочка обозначает  $p < 0,05$  против системы без добавок.

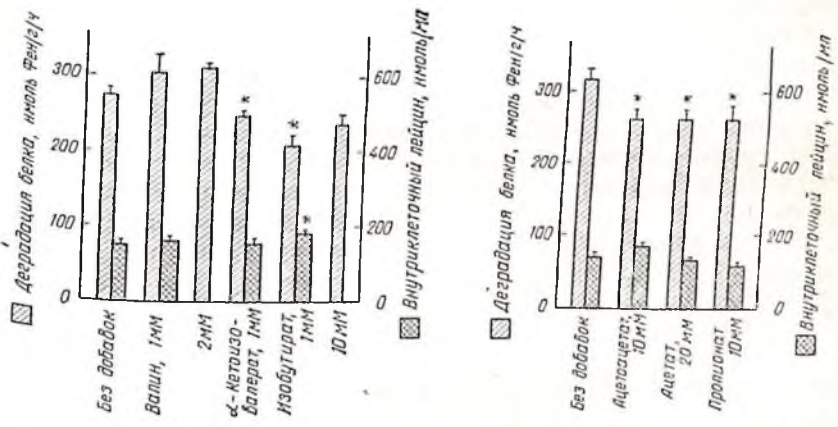


Рис. 126. Действие валина и его метаболитов на протеолиз и внутриклеточный лейцин. Сердца перфузировали так, как описано в подписи к рис. 123. Приведенные величины представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка для 6—10 сердец. Звездочки обозначают  $p < 0,05$  против системы без добавок.

Рис. 127. Влияние метаболитов аминокислот с разветвленной цепью на протеолиз и внутриклеточное содержание лейцина. Сердца перфузировали так, как описано в подписи к рис. 123. Величины представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка для 6—11 сердец. Звездочки обозначают  $p < 0,05$  против системы без добавок.

концентрацию лейцина. Аналогичные эффекты наблюдались в случае изовалерата (см. рис. 124) и изобутирата (см. рис. 126) — продуктов декаброксирования лейцина и валина. Гликовая кислота, чье производное с КоА является интермедиатом окисления изолейцина, ингибировала разрушение белка, будучи добавленной в концентрации 10 мМ (см. рис. 125). Продукты окисления разветвленных аминокислот, ацетоацетат, ацетат и пропионат также ингибировали протеолиз, но не влияли на внутриклеточную концентрацию лейцина (см. рис. 127). Эти метаболиты быстро утилизируются сердечной мышцей [16] и были добавлены в концентрациях, достаточных для поддержания общего потребления кислорода в течение более 2 ч. Эти результаты показывают, что лейцин был уникальным среди разветвленных аминокислот по отношению к ингибированию протеолиза. Однако метаболиты разветвленных аминокислот могли имитировать эффект лейцина. Некоторые из этих метаболитов не увеличивали концентрацию внутриклеточного лейцина.

#### **Влияние разветвленных аминокислот и их метаболитов на синтез белка**

В предыдущих экспериментах добавление пятикратных нормальных плазменных уровней аминокислот ускоряло белковый синтез; аналогичный эффект мог быть получен путем введения пятикратных нормальных плазменных уровней аминокислот с разветвленной цепью [3]. Настоящие эксперименты показывают, что лейцин (а не лейцин или валин) стимулировал белковый синтез. Метаболиты разветвленных аминокислот, включая изобутират, ацетоацетат, ацетат и пропионат, ускоряли белковый синтез. Среди этой группы только ацетоацетат увеличивал внутриклеточную концентрацию лейцина. Эти данные подтверждают предыдущие наблюдения, что окисляемые некарбогидратные субстраты, такие, как жирные кислоты, кетоновые тела, пируват, лактат и ацетат, поддерживают белковый синтез [3]. Лейцин был уникальным среди разветвленных аминокислот в отношении этого эффекта.

#### **Влияние лейцина на метаболизм белка в работающем сердце**

Как отмечалось выше, лейцин ускорял белковый синтез и ингибировал протеолиз в препаратах Лангендорфа в присутствии глюкозы в качестве окисляемого субстрата. Работа сердца в отградиацию белка. Введение лейцина в перфузат работающих сердец не влияло более на белковый синтез, но значительно уменьшало скорость деградации.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лейцин уменьшал отрицательный азотный баланс, характерный для препаратов Лангендорфа, так и для работающих сердец, перфузируемых буфером, содержащим глюкозу и нормальные для плазмы уровни аминокислот (табл. 38). Однако скорость белко-

ТАБЛИЦА 38  
ВЛИЯНИЕ ЛЕЙЦИНА НА МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКА В РАБОТАЮЩИХ СЕРДЦАХ КРЫС

Препарат	Лейцин, 1 мМ	Белковый синтез, нмоль фенилаланина в час	Дегградация белка
Лангендорфа	0	82 ± 4	272 ± 9
	+	102 ± 2*	235 ± 12*
Работающее сердце	0	112 ± 4**	243 ± 7**
	+	107 ± 2	172 ± 7**

Сердца перфузировали в течение 2 ч буфером, содержащим 15 мМ глюкозу и нормальные по отношению к плазменным уровни аминокислот, исключая лейцин и фенилаланин. Лейцин добавляли там, где это указано. При измерении белкового синтеза концентрации [<sup>14</sup>C]-фенилаланина была 0,4 мМ; при определении дегградации белка фенилаланин отсутствовал. Работающие сердца перфузировали иглой с внутренним диаметром 0,58 мМ, вставленной в отводящий путь аорты. Для каждого из приведенных условий перфузировали от 4 до 8 сердец. Показанные величины представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка.

\*  $p < 0,05$  против того же препарата без лейцина.  
\*\*  $p < 0,05$  против препаратов Лангендорфа, питаемых той же концентрацией лейцина.

вого синтеза составляла только 60% скорости дегградации в работающих препаратах, питаемых лейцином. Ни одна из других аминокислот, включая изолейцин и валин, не влияла на синтез или дегградацию в перфузируемых сердцах крыс (см. рис. 122, 124, 126). В сравнении с эффектом инсулина введение лейцина оказывало только умеренное влияние и на синтез и на дегградацию. С другой стороны, комбинированное действие лейцина и работы сердца на протеолиз было таким же большим, как и эффект инсулина (см. табл. 38, рис. 123). Механизм действия на белковый синтез и дегградацию не полностью понятен. Стимулирующее ее влияние на белковый синтез, по-видимому, включает ускорение инициации пептидной цепи [2, 3], тогда как ингибирование дегградации белка лейцином, вероятно, связано с увеличением латентности лисозом [16].

Лейцин быстро утилизировался перфузируемым крысиным сердцем [4, 17] (см. рис. 121). При концентрации лейцина в перфузате 1 мМ приблизительно 85% поглощенного сердцем лейцина декарбоксилировались и затем метаболизировались. Если лейцин, который метаболизировался, превращается количественно в ацетил-CoA и окисляется в цикле трикарбоновых кислот, то метаболизм этой аминокислоты отвечает за 36% поглощения кислорода миокардом (4,3 мкмоль/г сердца в минуту) [10] при уве-

личении концентрации лейцина в перфузате до 2 мМ. Эти данные не следует интерпретировать как указание на то, что лейцин является основным окисляемым субстратом *in vivo*. Как показано в табл. 37, поглощение лейцина сильно ингибировано в присутствии физиологических смесей субстратов и может обеспечивать только 0,2—2,3% поглощения кислорода в препаратах Лангендорфа и работающего сердца. Наоборот, эти данные указывают на то, что окисление лейцина строго контролируется и зависит от его концентрации, присутствия других окисляемых субстратов и уровня развиваемого желудочкового давления.

Поглощение и превращение изолейцина и валина до  $\text{CO}_2$  происходили со скоростью, составлявшей примерно 40% скорости, наблюдаемой с лейцином (см. табл. 37, рис. 121). Можно полагать, что эти соединения взаимодействуют с одной и той же транспортной [18] и, по-видимому, с одной и той же дегидрогеназой  $\alpha$ -кетокислот с разветвленной боковой цепью. Относительно этого вопроса ранние исследования [19] указывали на то, что в названный процесс может быть вовлечена более чем одна дегидрогеназа, но недавние эксперименты по очистке и описанию дегидрогеназ из печени и мышцы крыс показывают, что имеется один фермент [20—22]. В противоположность относительным скоростям поглощения лейцина и валина перфузируемым сердцем,  $\alpha$ -кетонизованная кислота декарбоксилировалась сердечными митохондриями со скоростью, в 2—3 раза большей, чем  $\alpha$ -кетонизованная кислота [23]. Эти результаты могли бы быть объяснены большим накоплением продукта метаболизма валина, такого, как изобутирил-КоА, по сравнению с продуктом декарбоксилирования лейцина — изовалерил-КоА. Последнее соединение конкурентно ингибирует дегидрогеназу из печени [21]. Существование различных стационарных уровней интермедиатов метаболизма изолейцина и валина и метаболизма лейцина не является неожиданным, так как первые из этих соединений входят в цикл трикарбоновых кислот в виде сукцинил-КоА и дают вклад в пул углерода. Полное окисление изолейцина и валина достигается только в том случае, если интермедиаты цикла превращаются в пируват, а затем в ацетил-КоА [24, 25]. С другой стороны, лейцин непосредственно превращается в ацетил-КоА и окисляется до  $\text{CO}_2$ . Необходимы дополнительные исследования, чтобы связать скорости метаболизма разветвленных аминокислот со стационарными уровнями интермедиатов в реакциях катаболизма.

Ни поглощение, ни окисление, ни внутриклеточное накопление лейцина не коррелировали с влиянием аминокислоты на деградацию белка (см. рис. 121, 123). Поглощение, окисление и та его концентрации в перфузате. Наоборот, максимальное ингибирование действия лейцина на протеолиз достигалось, когда его концентрация в перфузате доходила до 1 мМ. Аналогично увеличение синтеза и уменьшение деградации, возникавшее при пер-

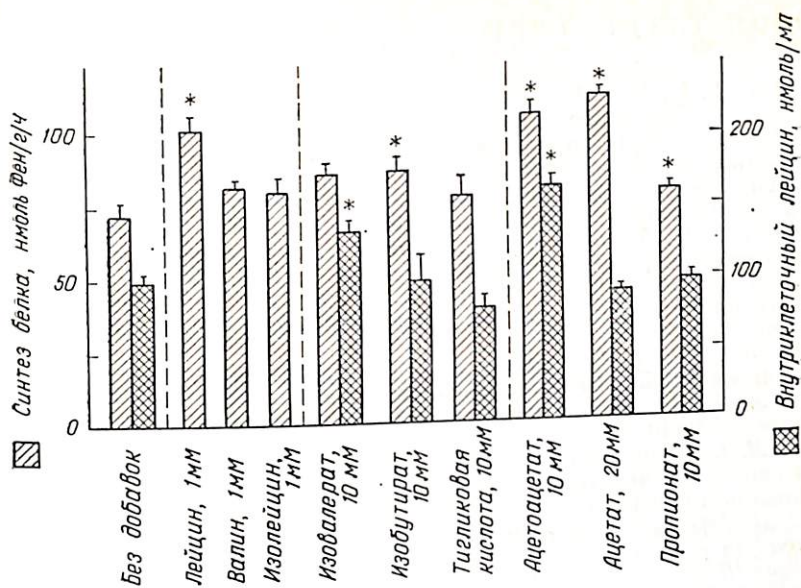


Рис. 128. Влияние аминокислот с разветвленной цепью и их метаболитов на белковый синтез. Сердца перфузировали 2 ч буфером, содержащим 15 мМ глюкозу, 0,4 мМ [ $^{14}$ C]-фенилаланин и нормальные, по отношению к плазме, уровни других аминокислот, за исключением соединений с разветвленной цепью. Добавки показаны на рисунке. Величины представляют собой среднее из 6—12 измерений. Звездочки обозначают  $p < 0,05$  против системы без добавок.

Функции ацетатом и пропионатом, не было, например, связано с увеличением внутриклеточной концентрации лейцина (рис. 128, также см. рис. 127). Эти факты предполагают, что ингибирование разрушения белка могут включаться факторы, иные, чем внутриклеточная концентрация лейцина и его окисление, такие, как тканевые уровни его метаболитов. К метаболитам лейцина, которые могут быть связаны с ускорением белкового синтеза и ингибирования деградации белка, относятся: а) интермедиаты, участвующие в белковом синтезе, или б) метаболиты, чья внутриклеточная концентрация изменяется в результате трансаминирования, декарбоксилирования и окислений лейцина. Альтернативное объяснение состоит в том, что из-за компарментализации аминокислот в сердце [12] увеличение концентрации лейцина в отдельных компартаментах клеток может быть ответственно за его ингибирующий эффект [7]. Регуляторный механизм может быть идентифицирован только в том случае, если измерения уровней метаболитов осуществляются в сердцах, питаемых лейцином и другими некарбогидратными субстратами, и когда эффекты потенциальных регуляторов исследуются в бесклеточной системе, осуществляющей инициацию пептидной цепи и протеолиз.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Morgan H. E., Earl D. C. N., Broadus A., Wolpert E. B., Giger K. E., Jefferson L. S.* Regulation of protein synthesis in heart muscle. I. Effect of amino acid levels on protein synthesis.—*J. biol. Chem.*, 1971, 246, 2152.
2. *Morgan H. E., Jefferson L. S., Wolpert E. B., Rannels D. E.* Regulation of protein synthesis in heart muscle.—II. Effects of amino acids and insulin on ribosomal aggregation.—*J. biol. Chem.*, 1971, 246, 2163.
3. *Rannels D. E., Hjalmarsen A. C., Morgan H. E.* Effects of non-carbohydrate substrates on protein synthesis on muscle.—*Am. J. Physiol.*, 1974, 226, 528.
4. *Buse M. G., Biggers J. F., Friderici K. H., Buse J. F.* Oxidation of branched-chain amino acids by isolated hearts and diaphragm of the rat.—*J. biol. Chem.*, 247, 8085.
5. *Fulks R. M., Li J. B., Goldberg A. L.* Effects of insulin, glucone, and amino acids on protein turnover in diaphragm.—*J. biol. Chem.*, 1975, 250, 290.
6. *Buse M. G., Reid S. S.* Leucine: A possible regulator of protein turnover in muscle.—*J. clin. Invest.*, 1975, 56, 1250.
7. *Buse M. G., Weigand D. A.* Studies concerning the specificity of the effect of leucine on turnover of proteins in muscles of control and diabetic rats.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 475, 81.
8. *Li J. B., Jefferson L. S.* Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle.—*Biochim. biophys. Acta*, 1978, 544, 351.
9. *Morgan H. E., Neely J. R., Wood R. E., Liebecq C., Liebermeister H., Park C. R.* Factors affecting the transport of glucose in heart muscle and erythrocytes.—*Fed. Proc.*, 1965, 24, 1040.
10. *Neely J. R., Liebermeister H., Battersby E. J., Morgan H. E.* Effects of pressure development on oxygen consumption by the isolated rat heart.—*Am. J. Physiol.*, 1967, 212, 804.
11. *Hems R., Ross B. D., Berry M. N., Krebs H. A.* Gluconeogenesis in perfused rat liver.—*Biochem. J.*, 1966, 101, 284.
12. *McKee E. E., Cheung J. Y., Rannels D. E., Morgan H. E.* Measurement of the rate of protein synthesis and compartmentation of heart phenylalanine.—*J. biol. Chem.*, 1978, 253, 1030.
13. *Rubin I. B., Goldstein G.* An ultrasensitive isotope dilution method for the determination of L-amino acids.—*Ann. Biochem.*, 1970, 33, 244.
14. *Chua B., Kao R., Rannels D. E., Morgan H. E.* Hormonal and metabolic control of proteolysis.—*Biochem. Soc. Symp.*, 1978, 43, 1.
15. *Chua B., Kao R. L., Rannels D. E., Morgan H. E.* Inhibition of protein degradation by anoxia and ischemia in perfused rat heart.—*J. biol. Chem.* In press.
16. *Chua B., Siehl D. L., Morgan H. E.* Effect of leucine and metabolites of branched-chain amino acids on protein turnover in heart.—*J. Biol. Chem.* Submitted for publication.
17. *Clarke E. W.* A simplified heart-oxygenator preparation suitable for isotope experiments: With some observations on the metabolism of acetate, pyruvate and amino acids.—*J. Physiol.*, 1957, 136, 380.
18. *Ichihara A., Noda C., Ogawa K.* Control of leucine metabolism with special reference to branched-chain amino acid transaminase.—*Adv. Enz. Regul.*, 1973, 11, 155.
19. *Connelly J. L., Danner D. J., Bowden J. A.* Branched-chain  $\alpha$ -keto acid metabolism.—*J. biol. Chem.*, 1968, 243, 1198.
20. *Danner D. J., Lemmon S. K., Elsas L. J.* II. Substrate specificity and stimulation by thiamine pyrophosphate of rat liver branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase.—*Biochem. Med.*, 1978, 19, 27.
21. *Perker P. J., Randle P. J.* Partial purification and properties of branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase of ox liver.—*Biochem. J.*, 1978, 171, 751.
22. *Odessey R., Goldberg A. L.* Leucine degradation in cell-free extracts of skeletal muscle.—*Biochem. J.*, 1979, 178, 475.

23. Bremer J., Davis F. J. The effect of acylcarnitines on the oxidation of branched-chain  $\alpha$ -ketoacids in mitochondria.—*Biochim. biophys. Acta*, 1978, 528, 269.
24. Goldstein L., Newsholme F. A. The formation of alanine from amino acids in diaphragm muscle of the rat.—*Biochem. J.*, 1976, 154, 555.
25. Chang T. W., Goldberg A. L. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle.—*J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 3685.

УДК 612.172.014.24:576.315.42].017.2:612.273.2

## ИЗМЕНЕНИЯ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ХРОМАТИНА МИОКАРДА КРЫС ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

И. А. ФЕДОРОВА, Н. В. МАЗУРОВ, Л. Б. НЕСТЕРЧУК (СССР)

Становление состояния адаптации к гипоксии характеризуется увеличением как мощности внешней дыхательной системы и кровообращения, так и способности клеток утилизировать кислород. Последнее является в первую очередь результатом усиления биогенеза митохондрий [1, 2]. Поскольку только 10% белков митохондрий кодируется собственно митохондриальной ДНК, очевидно, что синтез составных частей митохондрий и их упорядоченная сборка представляют собой сложные многоступенчатые процессы, находящиеся под двойным контролем хромосомальных и митохондриальных генов [3]. Следовательно, можно предположить, что увеличение биогенеза митохондрий в условиях адаптации к гипоксии происходит на фоне возросшей транскрипционной активности ядерного генома.

Поскольку изменения матричной активности хроматина обуславливаются модификацией его белковых компонентов и (или) вариациями в их пространственной организации, сравнительные исследования антигенных свойств хроматина представляют очевидный интерес. Преимущество использования иммунохимических приемов в подобного рода исследованиях заключается в возможности выявить изменения не только в составе белков, но и в пространственной организации их антигенных детерминант.

В данной работе адаптацию к прерывистому действию гипоксии осуществляли помещением животных (крыс) в барокамеру на 6 ч ежедневно в течение 30 дней при «высоте» 7 км. Хроматин выделяли из ядер сердечной мышцы по методу Widnell и соавт. [4]. Антисыворотки получали иммунизацией кроликов породы шиншилла. Препараты хроматина вводили внутримышечно с адъювантом Фрейнда (1:1). Реимунизацию проводили через 45—60 дней. За весь цикл иммунизации вводили около 40 мг тотального белка хроматина сердечной мышцы. В некоторых опытах использовали гамма-глобулиновую фракцию иммунных сывороток [5]. Сравнение белков хроматина сердечной мышцы адаптирован-



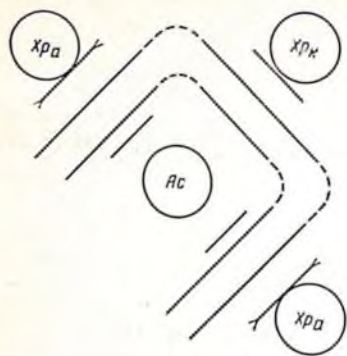


Рис. 129. Линии преципитации, образованные антисывороткой к хроматину сердца крысы и хроматином сердца крысы. Ас — антисыворотка; Хр<sub>к</sub> — хроматин контрольных животных; Хр<sub>а</sub> — хроматин животных, адаптировавшихся к гипоксии.

(рис. 129). Такое расположение дополнительных линий преципитации указывает на «появление» в хроматине адаптированных животных антигенных детерминант, резко отличающихся по скорости диффузии в геле и, следовательно, имеющих различную молекулярную массу. Поскольку в наших опытах в реакциях двойной иммунодиффузии использовалась антисыворотка к хроматину контрольных животных, можно полагать, что при этом выявлялись количественные различия в иммуногенных свойствах хроматина контрольных и адаптированных к гипоксии животных. Иными словами, в хроматине сердечной мышцы при адаптации к гипоксии открывается дополнительное количество тех антигенных детерминант, которые были открыты и обладали иммуногенными свойствами в хроматине сердечной мышцы контрольных животных.

Аналогичные результаты были получены одним из нас ранее при сравнении антигенных свойств хроматина мозга и печени крыс, адаптированных к прерывистой гипоксии, и контрольных [7]. Можно полагать, что при адаптации к гипоксии в хроматине тканей, особенно чувствительных к недостатку кислорода, происходят значительные конформационные перестройки, приводящие к изменениям в степени экранированности антигенных группировок.

Данные, полученные в опытах *in vitro*, также свидетельствуют о том, что дефицит кислорода вызывает изменения белкового состава, структуры и функциональной активности ядерного генома. Так, сжатие парциального давления кислорода приводило к образованию пухов в нескольких участках политенных хромосом

дрозофиллы, что указывало на локальное увеличение транскрипции [8, 9]. В условиях пониженного содержания кислорода (5%) отмечено увеличение содержания полиаминов и возрастание более чем в 3 раза ацетилирования гистонов в культуре клеток желудочков сердца куриных эмбрионов [10].

В настоящее время отсутствуют данные, на основании которых можно было бы объяснить молекулярные механизмы воздействия дефицита кислорода на содержание полиаминов и ацетилирование гистонов. Однако установление фактов накопления полиаминов и резкого возрастания степени ацетилирования гистонов указывает на возможные причины перестройки ядерного генома и увеличения его транскрипции в условиях гипоксии.

Обнаружение нами изменения спектра поверхностно расположенных антигенных детерминант хроматина сердечной мышцы является, по-видимому, следствием модификации некоторых белков и изменения пространственной организации хроматина. Подобные конформационные перестройки генетического материала представляют собой, вероятно, одно из необходимых звеньев процесса адаптации к гипоксии, происходящего на клеточном уровне. При этом возрастает, по-видимому, транскрипция в тех областях генома, которые контролируют синтез ферментов окислительного фосфорилирования и цитохромов.

Дальнейшее изучение изменений антигенных свойств хроматина при экстремальных воздействиях и адаптации к ним должно сочетаться с идентификацией белков и их комплексов, ответственных за формирование спектра «открытых» антигенных детерминант хроматина, определяющих его иммунные свойства.

Значение представленных выше данных состоит в том, что до настоящего времени в опытах *in vivo* существенные отличия спектра хроматина одноименной ткани данного вида отмечались лишь при таких процессах, как злокачественное перерождение и регенерация (печень). В данном исследовании выявляются изменения, не связанные ни с нарушением типа пролиферации, ни с процессом дифференциации ткани. Они отражают лишь некоторую функциональную перестройку метаболизма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меерсон Ф. З., Помойницкий В. Д., Ямпольская В. А. Роль биогенеза митохондрий в адаптации к высотной гипоксии. — Докл. АН СССР, 1972, 203, 973—976.
2. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. — М.: Наука, 1975.
3. Нейфах С. А. Механизм клеточной интеграции в процессе биогенеза митохондрий. — В кн.: Генетические функции органоидов цитоплазмы. Л.: Наука, 1974, с. 58—70.
4. Widnell C. S., Hamilton I. A., Tata J. R. The isolation of enzymically active nuclei from the rat. heart and uterus. — J. cell Biol., 1967, 32, 766—770.
5. Levy H. B., Sober H. A. A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1960, 103, 250—252.

6. Гусев А. И., Цветков В. С. К технике постановки реакции микропреципитации в агаре. — Лабор. дело, 1961, 2, 43—45.
7. Ашмарин И. П., Конарев В. Г., Сидорова В. В. и др. Изменение белкового состава хроматинного мозга и печени крыс при функциональной перестройке клеток. Влияние адаптации к гипоксии. — Докл. АН СССР, 1976, 228, 222—224.
8. Leenders H. J., Berendes H. D. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in drosophila. I. The induction of gene activity. — Chromosoma, 1972, 37, 433—444.
9. Koninks J. J. G., Leenders H. J., Birt L. M. A correlation between newly induced gene activity and enhancement of mitochondrial enzyme activity in the salivary glands. — Exp. cell Res., 1975, 92, 275—282.
10. Clo C., Orlandini C. C., Guarnieri C., Caldarella C. M. Role of oxygen on growth rate and gene activity in cultured chick-embryo heart cells. — Biochem. J., 1976, 154, 253—256.

УДК 612.173.1.015.33-087.45

## ИЗУЧЕНИЕ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ С ПОМОЩЬЮ ИЗОТОПА $^{15}\text{N}$

О. И. ПИСАРЕНКО, А. В. АРТЕМОВ, В. Н. СМИРНОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению одного из аспектов метаболизма азота — исследованию механизмов связывания свободного аммиака в мышце сердца. На экспериментальных моделях сердца [1—2] и у пациентов, страдающих различными заболеваниями сердца [3—5], были обнаружены образование аммиака при сокращении сердечной мышцы и его выброс в кровь коронарного синуса. Исследования, проведенные на больных, показали, что процессы образования и связывания аммиака в сердце весьма лабильны, его содержание в крови коронарного синуса может сильно варьировать, причем наблюдается как поглощение, так и выделение этого соединения мышцей сердца [3, 5—7]. Регуляция и контроль уровня свободного аммиака в сердечной мышце, характеризующейся интенсивным аэробным обменом, имеет особое значение, поскольку это вещество обладает сильными цитотоксическими свойствами [8].

Изучение коронарной артериовенозной разницы азотистых компонентов крови, проведенное в модельных опытах на животных [3, 9, 10] и у больных с различной сердечной патологией, показало, что лишь незначительная часть аммиака выводится в кровотоке в свободной форме. Образующийся при сокращении сердечной мышцы аммиак может связываться при реакции с 2-оксоглутаратом по реакции [9]. Другим способом выведения аммиака из сердца является образование глутамина [9, 11, 12]. Имеются данные о возможности удаления аммиака в форме



ват (5 мМ). Обработку ткани сердца проводили описанным выше методом.

Перфузию сердец с экспериментальным инфарктом миокарда ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  проводили в условиях, указанных для интактных сердец. Некроз миокарда вызывали у крыс *in vivo* тремя внутривенными инъекциями изопротеренола (25 мг на 1 кг массы) с интервалом в 24 ч. Его наличие в субэпикардальных слоях миокарда подтверждали морфологически. Спустя 3 ч после третьей инъекции изопротеренола у анестезированных животных извлекали сердца для перфузии.

### Приготовление ткани и перфузата для определения содержания в них азотистых метаболитов

Экстракцию аминокислот и мочевины из ткани сердца проводили перхлорной кислотой. К замороженному в жидком азоте порошок ткани приливали 6%  $\text{HClO}_4$  (5 мл на 1 г ткани). Спустя 5 мин после оттаивания при комнатной температуре белки отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при  $0^\circ\text{C}$ . Супернатант доводили до pH 7,02 М  $\text{KOH}$  и ставили в лед на 30 мин. Осадок  $\text{KClO}_4$  удаляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин при  $0^\circ\text{C}$ . Супернатант упаривали в вакууме при  $40^\circ\text{C}$  до минимального объема, исключаяющего выпадение солей, и подкисляли до pH 2,2 2 М  $\text{HCl}$ .

Белки перфузата осаждали 3%  $\text{HClO}_4$  (5 мл на 1 мл перфузата). Все последующие операции были аналогичны приведенным выше.

Концентрация метаболитов азотистого обмена в безбелковых тканевых экстрактах и перфузатах определяли, используя аминокислотный анализатор «Beckman» M-121. Анализ проводили по одноколочному методу литий-цитратными буферами [14]. Внутренним стандартом служил норлейцин.

### Приготовление образцов аминокислот- $^{15}\text{N}$ и мочевины- $^{15}\text{N}$ для изотопного анализа

После перфузии сердец с ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  из безбелковых тканевых экстрактов и перфузатов выделяли меченные  $^{15}\text{N}$  аминокислоты и мочевины. Образцы экстрактов и перфузатов, полученные из 5 г влажной ткани, наносили на препаративную колонку (2,5×60 см) аминокислотного анализатора, заполненную литий-цитратным буфером, pH 2,80 со скоростью 260 мл/ч при  $40^\circ\text{C}$ . Фракции аминокислот и мочевины очищали от компонентов буфера при помощи ионообменных смол [15]. Элюаты упари-

Сухие остатки, содержащие аминокислоты и мочевины, сжигали в СНН-анализаторе в присутствии NiO в токе гелия. Продук-

ты полного окисления ( $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ) разделяли на хроматографической колодке СНН-анализаторе, заполненной полисорбом-Г. Азот улавливали 50 мг цеолита СаА в стеклянной ампуле при охлаждении жидким азотом. Из ампулы предварительно удаляли азот в токе гелия при  $300^\circ C$ . Количество азота в образце определяли по площади пика на хроматограмме. Для проведения изотопного анализа требовалось 100 мкг азота в пробе.

Содержание  $^{15}N$  в аминокислотах и мочевины определяли на масс-спектрометре МИ-1305.

### Статистическая обработка

Достоверность различий между данными, полученными в опытах на интактных и инфарцированных сердцах, оценивали с помощью критерия  $t$  Стьюдента. Кинетический анализ действия L-аминокислот на синтез мочевины проводили по специально разработанным программам на ЭЦВМ «МИР-1».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Обогащение $^{15}N$ аминокислот и мочевины при перфузии сердец ацетатом аммония $^{15}N$

#### Подбор условий перфузии

Перед проведением опытов по изучению переноса  $^{15}N$  из ацетата аммония- $^{15}N$  в аминокислоты и мочевины сердечной мышцы крысы необходимо было установить оптимальную концентрацию метки в перфузате и длительность перфузии. Концентрация ацетата аммония- $^{15}N$  должна была удовлетворять двум критериям: быть достаточно высокой, чтобы обеспечить измеримый уровень включения в азотистые соединения, но не настолько, чтобы привести к нарушениям метаболизма миокарда вследствие гипераммонии. Таким условиям отвечала концентрация ацетата аммония- $^{15}N$  2,2 мМ, соответствующая примерно 1,2 мМ тканевой концентрации аммиака. Градиент концентраций аммиака в системе сердце — перфузат должен способствовать диффузии ацетата аммония- $^{15}N$  в клетки миокарда и тем самым включению  $^{15}N$  в исследуемые соединения. Как показали исследования [16], перфузия интактного сердца крысы хлоридом аммония практически такой же концентрации (2,06 мМ) приводила к достоверному повышению содержания аммиака в ткани сердца [16]. С уменьшением содержания аммиака в ткани сердца до 1 мМ обогащения мочевины, аспарагиновой кислоты и аланина становились соизмеримыми с ошибками измерения  $^{15}N$ .

Предварительные опыты показали, что 30 мин перфузии 2,2 мМ ацетатом аммония- $^{15}N$  достаточно для регистрации вклю-

чений  $^{15}\text{N}$  в аммиокислоты и мочевины, достоверно превышающих ошибку измерения ( $\pm 0,005—0,010$  атом%). Более длительная перфузия (60 мин) приводила к уменьшению включения  $^{15}\text{N}$ . Одной из причин этого явления может быть разбавление метки немеченым аммиаком, образующимся при работе сердца и накапливающимся в перфузате. После 60 мин перфузии сердца 2,2 мМ ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  концентрация аммиака в перфузате возрастала в среднем до 2,3 мМ ( $p < 0,05$ ).

Для иллюстрации отмеченных выше особенностей включения  $^{15}\text{N}$  в азотистые соединения в табл. 39 приведены данные по обо-

ТАБЛИЦА 39

ВКЛЮЧЕНИЕ  $^{15}\text{N}$  В МОЧЕВИНУ ИНТАКТНОГО СЕРДЦА КРЫСЫ (АТОМ% ИЗБ.  $^{15}\text{N}$ ) \* ПРИ ПЕРФУЗИИ АЦЕТАТОМ АММОНИЯ —  $^{15}\text{N}$  (95,8 АТОМ%)

Время перфузии, мин	Концентрация ацетата аммония- $^{15}\text{N}$ в перфузате, мМ				
	0,1	1,0	1,6	2,8	3,4
30	0	$0,011 \pm 0,008$	$0,062 \pm 0,005$	$0,098 \pm 0,006$	$0,122 \pm 0,005$
60	0	$0,006 \pm 0,005$	$0,042 \pm 0,006$	—	$0,095 \pm 0,007$

\* Средние  $\pm$  ошибка средней;  $n = 3—6$ .

гащению мочевины  $^{15}\text{N}$ , полученные при различных условиях опыта. Перфузия сердец 0,1 мМ ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  (т. е. пятикратным избытком аммиака по сравнению с его физиологическим содержанием в плазме крови) не приводила к включению  $^{15}\text{N}$  в мочевины.  $^{15}\text{N}$  в мочевины обнаруживали при введении в сердце 1 мМ аммиака- $^{15}\text{N}$  в течение 30 мин. Однако в этом случае величина обогащения очень низка и соизмерима с ошибкой опыта. После перфузии сердец в течение часа той же концентрацией ацетата- $^{15}\text{N}$  включение  $^{15}\text{N}$  в мочевины снижалось более чем вдвое. Измерение содержания  $^{15}\text{N}$  становилось возможным при увеличении концентрации меченого аммиака в 100—150 раз по сравнению с его концентрацией в плазме крови, т. е. в диапазоне 1,6—3,4 мМ. Обогащение мочевины  $^{15}\text{N}$  увеличивалось с ростом концентрации метки в перфузате. При этом более высокие включения  $^{15}\text{N}$  регистрировали после 30 мин перфузии.

В последующих опытах синтез аминокислот- $^{15}\text{N}$  и мочевины- $^{15}\text{N}$  изучали перфузией сердец 2,2 мМ ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  в течение 30 мин. Для выяснения зависимости включения  $^{15}\text{N}$  в мочевины инфарктированного сердца были выполнены опыты с ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  концентрации 1,6; 2,8 и 3,4 мМ. Дальнейшее повышение концентрации метки рассматривалось как нецелесообразное из-за возможного цитотоксического эффекта аммиака.

**Оценка неферментативного обогащения азотистых соединений  $^{15}\text{N}$**

Включение  $^{15}\text{N}$  в мочевины (как и в другие исследуемые соединения) могло быть обусловлено не только ферментативным обогащением, но и загрязнением аммиаком- $^{15}\text{N}$  при выделении из биологического материала. Для оценки загрязнений аминокислот и мочевины в процессе их разделения на ионообменной колонке были проведены опыты с искусственной смесью помеченных соединений и ацетата аммония- $^{15}\text{N}$ . Количество помеченных аминокислот и мочевины в смеси соответствовало их содержанию в 5 г ткани сердца крысы. Ацетат аммония- $^{15}\text{N}$  (95,8 атом%) брали в количестве, необходимом для перфузии 5 сердец из расчета 4 мМ раствора. Смесь наносили на препаративную колонку аминокислотного анализатора. Последующие стадии выделения азота воспроизводили без изменений. Обогащение мочевины  $^{15}\text{N}$  в этих опытах составило 0,005 атом% изб.  $^{15}\text{N}$ , а аминокислот — в среднем 0,010—0,012 атом% изб.  $^{15}\text{N}$ , что лишь вдвое превышало ошибку измерения.

Инкубация этой же смеси в бикарбонатном буфере Кребса — Хензелийта в течение 60 мин при 40°С с последующим разделением на колонке аминокислотного анализатора показала, что изотопный обмен между ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  и мочевиной составляет не более 0,003, а аминокислотами — 0,005—0,008 атом% изб.  $^{15}\text{N}$ . Таким образом, обогащение мочевины  $^{15}\text{N}$  за счет неферментативных процессов в опытах по перфузии ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  концентрации 1,6—3,4 мМ не должно превышать в среднем 9% от величин, указанных в табл. 39. Отметим, что обогащение мочевины  $^{15}\text{N}$  среди исследуемых соединений было самым низким.

**Включение  $^{15}\text{N}$  в азотистые соединения интактного и инфарцированного сердец**

Данные о включении  $^{15}\text{N}$  в аминокислоты и мочевины интактного сердца крысы после 30 мин перфузии 2,2 мМ ацетатом аммо-

**ТАБЛИЦА 40**  
**ВКЛЮЧЕНИЕ  $^{15}\text{N}$  В АМИНОКИСЛОТЫ И МОЧЕВИНУ ИНТАКТНОГО И ИНФАРЦИРОВАННОГО СЕРДЕЦ КРЫСЫ (АТОМ% ИЗБ.  $^{15}\text{N}$ ) \* ПОСЛЕ 30 МИН ПЕРФУЗИИ 2,2 ММ АЦЕТАТОМ АММОНИЯ- $^{15}\text{N}$  (95,8 АТОМ%)**

Соединение	Интактное сердце	Инфарцированное сердце
Аспарагиновая кислота	0,40 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Аланин	0,316 ± 0,007	0,181 ± 0,007
Глутаминовая кислота	0,560 ± 0,007	0,46 ± 0,02
Глутамин	0,481 ± 0,008	0,37 ± 0,01
Мочевина	0,078 ± 0,006	0,126 ± 0,006

\* Средния ± ошибка средней; n=3—5.



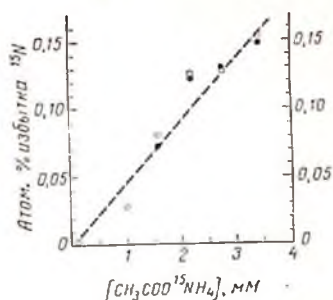
ния- $^{15}\text{N}$  приведены в табл. 40. Перенос из ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  наблюдали во все исследуемые соединения. Наиболее высоким было включение  $^{15}\text{N}$  в глутаминовую кислоту и глутамин. В меньшей степени обогащались аспарагиновая кислота и аланин. Различия между изотопным составом азота аминокислот относительно невелики. Мочевина обогащалась  $^{15}\text{N}$  значительно меньше, чем аминокислоты.

В течение 30 мин рециркуляционной перфузии 2,2 мМ ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  в системе сердце — перфузат устанавливалось равновесное состояние, характеризующееся равенством концентраций  $^{15}\text{N}$  в соединениях, находящихся в ткани миокарда и среде. Специально проведенные измерения показали, что обогащения  $^{15}\text{N}$  одного и того же вещества, выделенного из перфузионной среды и ткани сердца, равны друг другу. Это обстоятельство позволило выделять мочевину для изотопного анализа из перфузатов (из-за значительного накопления в них в результате диффузии из сердца при перфузии), а аминокислоты — из экстрактов мышцы сердца.

Поскольку известно, что метаболизм аммиака при инфаркте миокарда претерпевает глубокие изменения, представлялось интересным проследить за изменениями в синтезе аминокислот- $^{15}\text{N}$  и мочевины- $^{15}\text{N}$  в мышце инфарцированного сердца крысы. Результаты по включению  $^{15}\text{N}$  в азотистые соединения инфарцированного сердца крысы сопоставлены с данными по обогащению  $^{15}\text{N}$  этих соединений в интактном сердце (см. табл. 40). Экспериментальный инфаркт миокарда приводил к понижению включения  $^{15}\text{N}$  во все аминокислоты. Особенно велико уменьшение включения  $^{15}\text{N}$  в аспарагиновую кислоту и аланин (на 48 и 42% соответственно;  $p < 0,02$ ). Уменьшение концентрации  $^{15}\text{N}$  в этих аминокислотах соответствует резкому угнетению аланин- и аспарагинотрансферазы, наблюдаемому при повреждениях миокарда, вызванных изопроterenолом [17]. Снижение содержания  $^{15}\text{N}$  в продуктах трансаминирования глутаминовой кислоты и глутаминна (на 23%;  $p < 0,02$ ) может быть также следствием низкого обогащения  $^{15}\text{N}$  самой глутаминовой кислоты. Если считать, что перенос  $^{15}\text{N}$  из меченого аммиака в аминогруппу глутаминна происходит в основном при восстановительном аминировании 2-оксоглутарата, то уменьшение обогащения этой аминокислоты (на 20%;  $p < 0,005$ ) должно свидетельствовать о снижении активности глутаматдегидрогеназы в инфарцированном сердце. В противоположность аминокислотам образование мочевины- $^{15}\text{N}$  в таком сердце происходит более интенсивно: увеличение включения  $^{15}\text{N}$  в мочевину составляет 0,048—0,006 атом% изб.  $^{15}\text{N}$ , что соответствует 62% ( $p < 0,02$ ).

Синтез мочевины- $^{15}\text{N}$  в сердце с экспериментальным инфарктом миокарда был изучен при различных концентрациях ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  (рис. 130). Эти опыты показали, что степень обогащения мочевины  $^{15}\text{N}$  увеличивается с увеличением содержания

Рис. 130. Зависимость включения в мочевищу инфарцированного сердца крысы от концентрации ацетата аммония  $^{15}\text{N}$  в перфузате. Сердце 30 мин перфузировали ацетатом аммония  $^{15}\text{N}$  (95,8 атом%) концентрации 0,1; 1,0; 1,6; 2,2; 2,8; 3,4 мМ. Включение  $^{15}\text{N}$  в мочевищу, выделенную из перфузатов, обозначено черными кружками, в мочевищу ткани сердца — светлыми. Каждая точка — среднее значение, полученное в серии из 3—4 опытов.



аммиака- $^{15}\text{N}$  в перфузионной среде, причем для всех концентраций ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  величины обогащения  $^{15}\text{N}$  мочевищу в инфарцированном сердце были выше, чем в интактном.

### Содержание аминокислот и мочевины в системе сердце — перфузат после перфузии ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$

Для выяснения количественных соотношений между азотистыми соединениями, синтезированными при перфузии сердца ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$ , было определено их содержание в ткани сердца и перфузате. Необходимость учета общего содержания азотистых соединений в системе сердце — перфузат была обусловлена их диффузией из клеток миокарда в среду в ходе перфузии. Данные о содержании аминокислот и мочевины в системе сердце — перфузат после перфузии интактных и инфарцированных сердец, меченным аммиаком, приведены в табл. 41.

ТАБЛИЦА 41  
СУММАРНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И МОЧЕВИНЫ (МКМОЛЬ НА 1 Г ВЛАЖНОЙ ТКАНИ) В ТКАНИ СЕРДЦА КРЫСЫ И ПЕРФУЗАТЕ ПОСЛЕ 30 МИН ПЕРФУЗИИ 2,2 ММ АЦЕТАТОМ АММОНИЯ =  $^{15}\text{N}$  (95,8 АТОМ%)

Соединение	Контроль*	Интактное** сердце	Инфарцированное** сердце
Аспарагиновая кислота	$0,62 \pm 0,08$	$0,76 \pm 0,10$	$0,98 \pm 0,12$
Аланин	$1,22 \pm 0,16$	$1,92 \pm 0,14$	$1,91 \pm 0,15$
Глутаминовая кислота	$3,08 \pm 0,20$	$3,75 \pm 0,24$	$4,22 \pm 0,28$
Глутамин	$3,68 \pm 0,21$	$4,93 \pm 0,12$	$3,90 \pm 0,18$
Мочевина	$1,00 \pm 0,08$	$1,44 \pm 0,05$	$1,59 \pm 0,06$

\* Содержание аминокислот и мочевины в интактном перфузированном сердце крысы, отмытом от крови 25 мл буфера Krebsa—Хензелийта;  $n=6$ .  
\*\* Средний  $\pm$  ошибка средней;  $n=3-5$ .

В системах интактного и инфарцированного сердца содержание метаболитов азотистого обмена в основном соответствовало их концентрациям в отмытом от крови перфузированном сердце

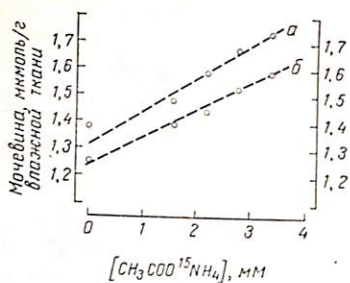


Рис. 131. Зависимость суммарного содержания мочевины в ткани и перфузате интактного (а) и инфарцированного (б) сердца крысы от концентрации введенного ацетата аммония  $^{15}N$ . Сердца перфузировали 30 мин ацетатом аммония —  $^{15}N$  концентрации 1,6; 2,2; 2,8; 3,4 мМ и буфером Кребса — Хензельяита без ацетата аммония  $^{15}N$ . Каждая точка — среднее значение, полученное в серии из 3—4 опытов.

крысы. Значительных изменений в соотношениях метаболитов после перфузии сердец 2,2 мМ ацетатом аммония не обнаружено. Так же как и в ткани сердца крысы, наиболее высокое содержание отмечено для глутамина и глутаминовой кислоты; за ними в порядке уменьшения концентраций следуют аланин, мочевины и аспарагиновая кислота.

В системе инфарцированное сердце — перфузат обращают на себя внимание значительная убыль глутаминна — основного переносчика аммиака в миокарде (на  $1,03 \pm 0,18$  мкмоль/г ткани;  $p < 0,02$ ) и повышенное содержание мочевины (на  $0,15 \pm 0,06$  мкмоль/г ткани;  $p < 0,05$ ) по сравнению с содержанием этих соединений в ткани и перфузате интактного сердца. Изменения в содержании глутаминовой и аспарагиновой кислот в системе инфарцированное сердце — перфузат недостоверны ( $p > 0,05$ ). Концентрации аланина в ткани и перфузате интактного и инфарцированного сердец совпадают. Общее содержание азотистых соединений, принимающих участие в связывании аммиака, в ткани и перфузате инфарцированного сердца ниже, чем в системе интактное сердце — перфузат.

Содержание мочевины в ткани и перфузате инфарцированного сердца после его перфузии буфером Кребса — Хензельяита без ацетата аммония- $^{15}N$  было выше, чем в системе интактного сердца ( $1,39 \pm 0,07$  и  $1,24 \pm 0,05$  мкмоль на 1 г ткани соответственно). Повышенное содержание мочевины в системе инфарцированное сердце — перфузат сохранялось и при нагрузке сердец различными концентрациями ацетата аммония- $^{15}N$  (рис. 131). Линейный характер увеличения содержания мочевины с ростом концентрации вводимого аммиака соответствовал зависимости обогащения этого соединения  $^{15}N$  от концентрации метки (см. рис. 130).

### Содержание $^{15}N$ в аминокислотах и мочевины интактного и инфарцированного сердец

Исходя из данных по обогащению  $^{15}N$  аминокислот и мочевины и их содержанию в ткани сердца и перфузионной среде, определяли общее количество  $^{15}N$ , вошедшее в каждое из соединений при перфузии ацетатом аммония- $^{15}N$ . Содержание  $^{15}N$  в соедине-

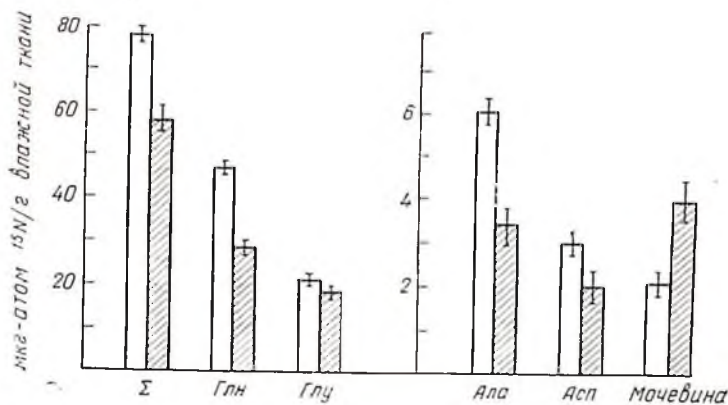


Рис. 132. Содержание <sup>15</sup>N в аминокислотах, мочевины и суммарное содержание <sup>15</sup>N в указанных соединениях интактного (светлый столбик) и инфарктированного (заштрихованный столбик) сердца крысы после 30 мин перфузии 2,2 мМ ацетатом аммония — <sup>15</sup>N (98,5 атом%). Каждая точка — среднее значение, полученное из серии 3—4 опытов.

ниях (микрограмм-атомах <sup>15</sup>N на 1 г ткани) рассчитывали по формуле:

$$q = \frac{m \cdot \text{атом } \% \text{ } ^{15}\text{N}}{100} \cdot n,$$

где  $m$  — содержание соединения в ткани миокарда и перфузате в мкмоль на 1 г ткани;  $n$  — число атомов азота в молекуле соединения; атом % <sup>15</sup>N — атом % изб. <sup>15</sup>N в соединении.

На рис. 132 приведены результаты расчета содержания <sup>15</sup>N в изученных соединениях после перфузии сердец 2,2 мМ ацетатом аммония-<sup>15</sup>N. Общее количество <sup>15</sup>N, перешедшее из ацетата аммония-<sup>15</sup>N в аминокислоты и мочевины интактного сердца, составляет  $0,080 \pm 0,003$  мкг-атом <sup>15</sup>N на 1 г ткани. Из этого количества около 60% приходится на глутамин:  $0,047 \pm 0,002$  мкг-атом <sup>15</sup>N на 1 г ткани. В меньшей степени аммоний-<sup>15</sup>N утилизируется глутаминовой кислотой:  $0,021 \pm 0,001$  мкг-атом <sup>15</sup>N на 1 г ткани, что соответствует примерно 26% <sup>15</sup>N, нейтрализованного изученными веществами. Оставшаяся часть <sup>15</sup>N распределяется между алаином (7%), аспарагиновой кислотой (4%) и мочевиной (3%). Суммарное поглощение <sup>15</sup>N аминокислотами и мочевиной интактного сердца составляет около 0,1% <sup>15</sup>N, введенного в перфузат в форме ацетата аммония-<sup>15</sup>N.

При перфузии инфарктированных сердец перенос <sup>15</sup>N в указанные азотистые соединения достоверно уменьшается до  $0,058 \pm 0,002$  мкг-атом <sup>15</sup>N на 1 г ткани ( $p < 0,02$ ), что соответствует расходу 0,073% <sup>15</sup>N содержавшегося в метке. Количество <sup>15</sup>N, приходящееся на глутамин в инфарктированном сердце, уменьшается на 40% до  $0,028 \pm 0,001$  мкг-атом <sup>15</sup>N на 1 г ткани

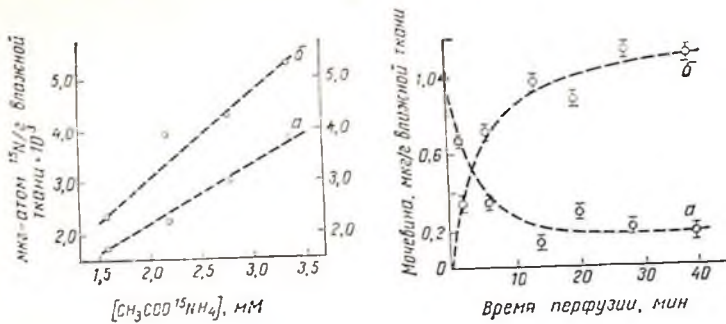


Рис. 133. Влияние концентрации ацетата аммония  $^{15}\text{N}$  в перфузате на содержание  $^{15}\text{N}$  в мочеине intactного (а) и инфарктированного (б) сердца крысы. Указанные значения соответствуют суммарному содержанию  $^{15}\text{N}$  в мочеине ткани сердца и перфузате. Каждая точка — среднее значение полученное из серии 3—5 опытов.

Рис. 134. Изменение содержания мочеины в ткани сердца крысы (а) и перфузате (б) при перфузии буфером Кребса — Хензелейта. Каждая точка среднее значение, полученное из серии 6—8 опытов. Темный треугольник — содержание мочеины в сердце крысы, отмытом от крови 25 мл буфера Кребса — Хензелейта,  $1,00 \pm 0,08$  мкмоль/г влажной ткани. Каждая точка — среднее значение, полученное из серии 20 опытов.

( $p < 0,02$ ), хотя, так же как и в intactном сердце, это вещество нейтрализует основное количество аммиака- $^{15}\text{N}$  — около 50%. Поглощение  $^{15}\text{N}$  аминокислотами инфарктированного миокарда ниже, чем intactного: аспарагиновой кислотой — на 37% ( $p < 0,05$ ), алаином — 43% ( $p < 0,05$ ). Влияния экспериментального инфаркта на содержание  $^{15}\text{N}$  в глутаминовой кислоте не обнаружено ( $p > 0,05$ ). Содержание  $^{15}\text{N}$  в мочеине инфарктированного сердца увеличивается на 80% ( $p < 0,02$ ), однако этот прирост (0,002 мкг-атом  $^{15}\text{N}$  на 1 г ткани) на порядок меньше убыли  $^{15}\text{N}$  (0,021 мкг-атом  $^{15}\text{N}$  на 1 г ткани) за счет уменьшения включения этого изотопа в аминокислоты.

Количество  $^{15}\text{N}$ , нейтрализованное мочеиной, возрастает с увеличением концентрации ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  в перфузате (рис. 133), причем для всех концентраций мочеиног аммиака содержание  $^{15}\text{N}$  в мочеине инфарктированного сердца достоверно выше, чем в intactном.

Полученные данные подтверждают возможность связывания аммиака в мышце сердца по реакциям синтеза мочеины, хотя основное количество аммиака поглощается при образовании глутамина. Преобладание этого процесса над остальными механизмами нейтрализации аммиака не умаляет значения синтеза мочеины для миокарда. В сердце с экспериментальным инфарктом количество аммиака, выведенное этим путем, возрастает почти вдвое при подавлении образования связывающих аммиак аминокислот и глутамина.

## Образование мочевины при перфузии изолированного сердца L-аминокислотами и хлоридом аммония

Синтез мочевины- $^{15}\text{N}$  в сердце крысы из аммиака- $^{15}\text{N}$  не исключал возможности образования этого соединения из других предшественников. В опытах по изучению влияния других азотистых соединений на синтез мочевины в качестве доноров азота использовали L-аргинин, L-орнитин, L-глутамин, хлорид аммония, обычно применяемые для активирования этого процесса в печени [18, 19]. Было также оценено действие L-лейцина и пирувата.

Для контроля количества мочевины, синтезированной при перфузии сердца указанными соединениями, необходимо было определить исходный уровень этого вещества в ткани сердца до перфузии и изменения в содержании мочевины, вызываемое перфузией бикарбонатным буфером Кребса — Хензеляйта, не включающим добавок. Количество мочевины в сердце, отмытом от крови бикарбонатным буфером Кребса — Хензеляйта, составило  $1,00 \pm 0,08$  мкмоль на 1 г влажной ткани ( $n=20$ ).

Характер изменения содержания мочевины в ткани сердца крысы и среде при перфузии буфером Кребса-Хензеляйта показан на рис. 134. В ходе перфузии в результате диффузии мочевины из клеток миокарда происходило уменьшение ее содержания в ткани и накопление в перфузате. Концентрация мочевины, устанавливающаяся в ткани с течением времени, составляла  $0,19 \pm 0,04$  мкмоль на 1 г влажной ткани и, как показали опыты с введением в перфузат L-аминокислот, практически не зависела от состава среды. Концентрация мочевины в перфузате была в несколько раз выше, чем в ткани. Перфузия буфером Кребса — Хензеляйта приводила к приросту вещества с течением времени в системе сердце — перфузат. Общее количество мочевины в перфузате и ткани после 40 мин достоверно превышало содержание мочевины в отмытом сердце ( $1,26 \pm 0,10$  мкмоль на 1 г влажной ткани;  $p < 0,05$ ).

Влияние введенных в перфузат субстратов на синтез мочевины представлено на рис. 135. Перфузия буфером Кребса — Хензеляйта, содержащим предшественники мочевины — хлорид аммония и L-аргинин, значительно стимулировала образование мочевины в сердце. Спустя 40 мин перфузии этими веществами суммарное содержание мочевины в ткани сердца и среде увеличивалось на  $1,02 \pm 0,09$  и  $0,92 \pm 0,08$  мкмоль на 1 г влажной ткани соответственно ( $p < 0,02$ ). Меньший эффект обнаружен для L-орнитина ( $0,63 \pm 0,09$  мкмоль/г;  $p < 0,05$ ). Активирующее действие L-глутамин проявлялось лишь в поздних стадиях перфузии и было слабее, чем перечисленных предшественников: за 40 мин перфузии содержание мочевины в системе сердце — перфузат увеличивалось на  $0,38 \pm 0,10$  мкмоль на 1 г влажной ткани. При

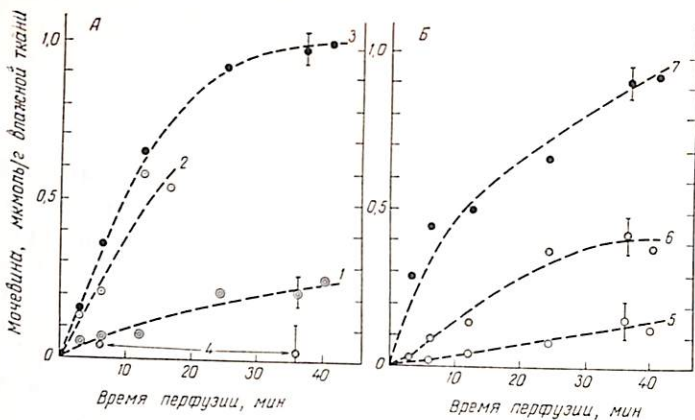
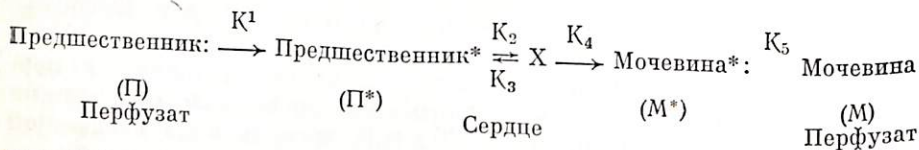


Рис. 135. Влияние различных субстратов на синтез мочевины при перфузии изолированного сердца крысы (А, Б). Сердца перфузировали буфером Кребса — Хензеляйта без добавок (1), буфером, содержащим L-орнитин, 10 мМ (2),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 мМ (3), пируват, 5 мМ (4), L-лейцин, 5 мМ (5), L-глутамин, 10 мМ (6), L-аргинин 10 мМ (7). Количество синтезированной мочевины определяли по разности между суммарным содержанием в ткани сердца и среде и исходным содержанием в отмытом от крови сердце ( $1,00 \pm 0,08$  мкмоль/г влажной ткани). Каждая точка — среднее значение, полученное из серии 6—8 опытов.

введении в перфузионную среду L-лейцина и пируват наблюдалось ингибирование синтеза мочевины ( $p < 0,05$ ).

Для количественной характеристики эффективности доноров азота мы воспользовались следующей кинетической моделью синтеза мочевины:



и предполагали, что он обусловлен только процессами, протекающими в сердце. Обмен между средой и тканью осуществляется путем диффузии донора азота в клетки миокарда ( $\text{П} \xrightarrow{K_1} \text{П}^*$ ), обратной диффузии синтезированной мочевины в среду ( $\text{М}^* \xrightarrow{K_5} \text{М}$ ). Предполагали, что стадии диффузии донора азота и мочевины протекают с большими скоростями, чем превращения, идущие в ткани сердца:  $K_1, K_5 \gg K_2, K_3, K_4$ . В условиях опытов  $[\text{П}] \gg [\text{П}^*]$  поэтому считали, что активный транспорт аминокислот из среды в клетки миокарда является практически необратимым процессом.

В этом случае скорость образования мочевины:

$$W_M = K_4 [X]. \quad (1)$$

Считая, что скорость образования промежуточного комплекса X и скорость его превращения приблизительно равны (стационарное состояние):

$$\frac{DX}{dt} = 0, \quad (2)$$

а также принимая, что

$$[P^*] = [X] + [M^*], \quad (3)$$

получим:

$$\frac{dx}{dt} = (K_2[X] + [M^*]) - (K_2 + K_3)[X] = 0. \quad (4)$$

Откуда

$$[X] = \frac{K_2[M^*]}{K_2 + K_3 - K_2} = K[M^*], \quad (5)$$

где

$$K = \frac{K_2}{K_3}.$$

Подставляя (5) в (1), получим окончательно:

$$W_M = K_{эфф}[M^*], \quad (6)$$

где  $K_{эфф} = K_4 \cdot K$  — эффективное значение константы скорости или после интегрирования:

$$\ln \left( \frac{\Delta}{[M_0^*]} + 1 \right) = K_{эфф} t, \quad (7)$$

где  $\Delta = [M^*] - [M_0^*]$  — прирост мочевины.

Из сопоставления экспериментальных (точки) и расчетных (прямые) данных в координатах  $\lg \left( \frac{\Delta}{[M_0^*]} + 1 \right)$  — время перфузии (см. рис. 136) следует, что предложенная кинетическая модель удовлетворительно описывает синтез мочевины в сердце при перфузии буфером Кребса — Хензеляйта без добавок, а также L-глутамином и L-лейцином в течение всего времени опыта, в случае остальных доноров азота — лишь для периода перфузии, не превышающего 12 мин. Для более продолжительной перфузии наблюдалось расхождение между расчетными и экспериментальными данными.

Приведенные в табл. 42 значения констант  $K_{эфф}$  свидетельствуют о том, что наиболее активными донорами азота являются L-аргинин и хлорид аммония. Эти результаты хорошо согласуются с данными ряда исследователей, полученными на изолированной печени крысы [18—20]. Введение в перфузионную среду L-орнитина и глутамината отвечает меньшим значениям констант  $K_{эфф}$ . Ингибирующая способность L-лейцина подтверждена наиболее низким значением  $K_{эфф}$ .



ТАБЛИЦА 42

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНУЮ КОНСТАНТУ СКОРОСТИ  
ОБРАЗОВАНИЯ МОЧЕВИНЫ ПРИ ПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА  
КРЫСЫ

W* Перфузионная среда		$K_{\text{эфф}} \cdot 10^2, \text{ мин}^{-1}$
1	l-аргинин, 10 мМ	2,88
2	$\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 мМ	1,98
3	l-орнитин, 10 мМ	1,62
4	l-глутамин, 10 мМ	0,62
5	Буфер Кребса—Хензеляйта	0,03
6	l-лейцин, 5 мМ	0,02

\* Соответствуют расчетным прямым на рис. 136.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изложенные выше экспериментальные данные позволяют рассмотреть некоторые особенности метаболизма в мышце сердца. Высокое обогащение глутамина  $^{15}\text{N}$  свидетельствует в пользу присутствия в миокарде глутаминсинтетазы, существование которой оспаривалось некоторыми исследователями из-за трудностей, связанных с ее выделением [21]. Включение  $^{15}\text{N}$  в аланин и аспарагиновую кислоту подтверждает предположение об участии соответствующих аминотрансфераз в связывании аммиака [12, 13].

Экспериментальный инфаркт миокарда приводит к значительным изменениям в метаболизме аммиака вследствие снижения активности ферментов трансаминирования и аминирования в сердечной мышце [17, 22]. Это проявляется в уменьшении связывания аммиака- $^{15}\text{N}$  аспарагиновой кислотой, аланином и глутамином (см. рис. 132). Существенно, что в инфарцированных сердцах синтез мочевины активизируется, хотя вклад глутаматдегидрогеназной и глутаминсинтетазной реакций в процессе детоксикации аммиака остается наиболее значительным. Симбатная зависимость между концентрацией ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  в перфузате и содержанием  $^{15}\text{N}$  в мочевины (см. рис. 133) подтверждает ранее сделанные выводы [4] о том, что синтез мочевины мышцей сердца является ответом на возрастание в ней уровня аммиака. Этот результат хорошо согласуется с увеличением активности аргиназы в зоне некроза мышцы сердца, наблюдавшейся при исследовании биопсийного материала человека [4].

Следует отметить, что усиление синтеза мочевины в инфарцированном сердце происходит при блокировании основного механизма связывания аммиака — ослабления синтеза глутамина (см. рис. 138). Таким образом, этот процесс можно рассматривать как компенсаторную перестройку азотистого обмена сердца в ответ на нарушение нормальных механизмов удаления аммиака. Эти данные соответствуют результатам, полученным по синтезу

мочевины при экспериментальном инфаркте миокарда собаки *in vivo* [10]. В этих опытах было обнаружено уменьшение скорости синтеза мочевины в печени, снижение уровня мочевины в крови при неизменном его содержании в сердце, сопровождающееся возрастанием уровня мочевины в крови коронарного синуса. Данное наблюдение не только подтверждает способность миокарда млекопитающих образовывать мочевины, но и показывает, что активация ее синтеза — компенсаторное явление при сердечной патологии.

Для мочевины в большей степени, чем для изученных аминокислот, обнаруживается несоответствие между ее синтезом в результате перфузии с меченым азотом (см. рис. 133) и увеличением ее суммарного содержания в системе интактное (или инфарцированное) сердце — перфузат (см. рис. 131). Так, например, при перфузии инфарцированного сердца 1,6 мМ ацетатом аммония- $^{15}\text{N}$  количество синтезированной мочевины- $^{15}\text{N}$  составляет 0,003 мкмоль на 1 г ткани (см. рис. 133), а ее абсолютный прирост в системе сердце — перфузат —  $0,011 \pm 0,005$  мкмоль/г (см. рис. 131). Абсолютный прирост уровня мочевины превышал количество синтезированного меченого соединения при всех концентрациях ацетата аммония- $^{15}\text{N}$ . Данный факт заставил проанализировать причины этого расхождения в условиях эксперимента и выбрать не противоречащие друг другу положения для его объяснения. При перфузии сердца возрастающими концентрациями ацетата аммония- $^{15}\text{N}$  содержание мочевины может увеличиваться в результате: а) синтеза из введенного аммиака- $^{15}\text{N}$  (в незначительной степени); б) образования аргинина при усиленном протеолизе под действием аммиака и при последующем расщеплении его аргиназой; в) ослабления дезаминирования мочевины [23]. Дальнейшие эксперименты позволяют оценить вклад перечисленных процессов более определенно.

Помимо солей аммония, синтез мочевины усиливается при введении в перфузат l-аргинина, l-орнитина, l-глутамина. Из этих аминокислот наиболее эффективен ближайший предшественник мочевины — аргинин (рис. 136, а также см. табл. 42). Возмож-

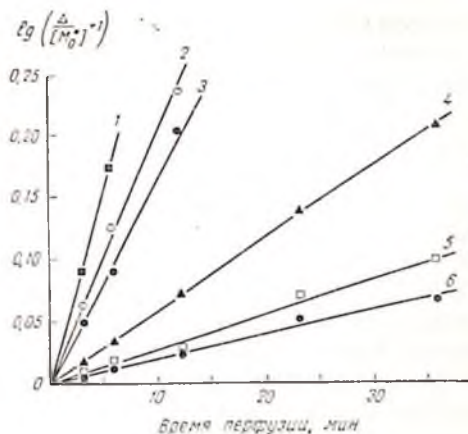


Рис. 136. Зависимость  $\lg\left(\frac{\Delta}{M_0} + 1\right)$  от времени перфузии для различных сред: 1 — l-аргинин, 10 мМ; 2 —  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 мМ; 3 — l-орнитин, 10 мМ; 4 — l-глутамин, 10 мМ; 5 — буфер Krebs—Ханзелайта; 6 — l-лейцин, 5 мМ.

аргинина была установлена нами в опытах по переносу  $^{15}\text{N}$  из аргинина- $^{15}\text{N}$  в мочевины [4]. Повышенный синтез мочевины под действием аргинина может быть связан не только с образованием этого соединения под влиянием аргиназы, но и со стимулирующей способностью образующегося из него орнитина, поскольку он также активировал синтез мочевины, хотя и в меньшей степени (табл. 42). L-глутамин оказывает меньшее влияние на образование мочевины по сравнению с эквимоллярными количествами L-аргинина и L-орнитина (см. табл. 42). Активность глутаминазы в сердце не так высока, чтобы обеспечить его эффективное снабжение аммиаком для синтеза карбамоилфосфата, несмотря на то, что глутамин легко проликает через клеточные мембраны [20]. Приrost мочевины, наблюдавшийся в поздних стадиях перфузии глутамином (см. рис. 135), может происходить за счет аммиака, образующегося при частичном гидролизе амидной группы глутаминна в перфузионной среде.

Как известно, накопление в ткани сердца аммиака, приводящее к ингибированию окислительного метаболизма, является патогенетическим фактором в развитии повреждений миокарда [9, 12, 24]. Поэтому активацию синтеза мочевины в мышце сердца L-аминокислотами можно рассматривать как метаболическую защиту от его токсического действия. В связи с этим не исключено, что наблюдавшееся улучшение восстановления сократимости ишемизированного миокарда под действием L-аргинина и L-глутаминовой кислоты [25] связано также с участием этих аминокислот в процессе детоксикации аммиака.

Из всех изученных азотистых соединений ингибирующее действие на синтез мочевины оказали L-лейцин и пируват. Действие L-лейцина может быть объяснено его стимулирующей глутаматдегидрогеназы в направлении образования глутаминовой кислоты и подавлением дезаминирующей активности этого фермента [26]. Поскольку глутаматдегидрогеназа ответственна за образование аммиака для участия его в карбамоилфосфатсинтетазной реакции и, следовательно, одного из двух атомов азота в молекуле мочевины, то причина ослабления синтеза мочевины в присутствии L-лейцина становится понятной. Весьма вероятно, что в сердце, как и в печени, лейцин ингибирует синтез цитруллинна из орнитина и тем самым блокирует образование мочевины [27].

Влияние пирувата на синтез мочевины в печени связано с высокой активностью орнитинпируваттрансферазы: пируват приводит к полному расходу орнитина и прерывает синтез мочевины [28]. Известно, что в сердце, как и в печени, происходит трансаминирование орнитина на пируват [29]. Так как уровень орнитина в миокарде намного ниже концентрации других метаболитов [4], его внутриклеточная концентрация может быть определяющим моментом в эффективности орнитинового цикла и соответственно синтеза мочевины. Пируват также способен блокировать превращение цитруллинна в аргинин — стадии, лимитирующей

скорость орнитинового цикла, как было показано на срезах печени [30, 31]. Эти соображения, вероятно, остаются справедливыми и для сердечной мышцы, поскольку в миокарде обнаружена активность аргининсукциназы и других ферментов орнитинового цикла [4, 32], хотя не исключено, что пути, приводящие к образованию мочевины в миокарде, не идентичны циклу мочевины в печени.

Полученные результаты синтеза аминокислот и мочевины в мышце сердца позволяют сделать следующие выводы.

1. Образующийся при сокращении сердечной мышцы аммиак, а также аммиак, поступающий в сердце с током крови, связываются аминокислотами и мочевиной миокарда. При этом основное его количество нейтрализуется глутамином и глутаминовой кислотой. В меньшей степени аммиак утилизируется аланином, аспарагиновой кислотой и по реакциям, приводящим к образованию мочевины.

2. Значение синтеза мочевины как дополнительного механизма регуляции уровня аммиака в ткани сердца возрастает при инфаркте миокарда. Активация этого процесса аминокислотами открывает возможность коррекции нарушений обмена аммиака при различных патофизиологических состояниях сердца.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark A. J., Gaddie R., Stewart C. P. Metabolism of the isolated heart of the frog.—*J. Physiol. (Lond.)*, 1931, 72, 443—446.
2. Feinberg H., Alma M. Ammonia production in the isolated working rabbit heart.—*Am. J. Physiol.*, 1961, 200, 238—242.
3. Чазов Е. И., Смирнов В. И., Мазаев А. И. и др. Коронарная артериовенозная разница в содержании некоторых продуктов азотистого обмена у человека. — *Кардиология*, 1972, 12, 10, 11—19.
4. Smirnov V. N., Asajov G. B., Cherpachenko N. M. et al. Ammonia neutralisation and urea synthesis in cardiac muscle.—*Circulat. Res.*, 1974, 35, 3, Supl. III, 58—69.
5. Brodan V., Falin J., Tomkova K. Metabolism of ammonia in the ischemic myocard at rest and during pacing.—*Cas. Lek. ces.*, 1975, 114, 31—32, 988—991.
6. Bessman A. N., Evans J. M. The blood ammonia in congestive heart failure.—*Am. Heart J.*, 1955, 50, 715—719.
7. Hani H. Blood ammonia levels in patients with chronic congestive heart failure.—*Noukogude Eesti Tervishoid (Soviet Estonian Health)*, 1973, 6, 495—496.
8. Katsunuma N., Okada M., Nishii Y. Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia.—*Adv. Enz. Regul.*, 1966, 4, 317—336.
9. Kobayashi T. Myocardial amide-nitrogen metabolism with special reference to ammonia metabolism.—*Jap. Circ. J.*, 1967, 31, 33—38.
10. Ферусова Т. В. Некоторые азотсодержащие компоненты сердца, крови коронарного сплуса и аорты при экспериментальном инфаркте миокарда. — *Кардиология*, 1976, 16, 6, 89—93.
11. Kato T. Myocardial amide-nitrogen metabolism with special reference to ammonia metabolism.—*Jap. Circ. J.*, 1968, 32, 1401—1416.
12. Watanabe T., Yamazaki N., Aoyama S. Significance of myocardial ammonia metabolism in the failing heart.—*Israel J. Med. Sci.*, 1969, 5, 4, 496—500.

13. *Carlsten A., Hallgren B., Jagenburg R. et al.* Myocardial metabolism of glucose, lactic acid, amino acids, fatty acids in healthy human individuals at rest and at different work loads.—Verh. Dtsch. ges. Kreisf-Forsch., 1961, 27, 195—196.
14. *Kedenburg C. P.* A lithium buffer system for accelerated single-column amino acid analysis in physiological fluids.—Annl. Biochem., 1971, 40, 35—42.
15. *Chain E. B., Chiozzotto M., Pocchiary F. et al.* Participation of the ammonium ion in the transformation of glucose to amino acids in brain tissue.—Proc. roy. Soc. (Lond.), 1960, 152, 290—297.
16. *Davidson S., Sonneblick E. H.* Glutamine production by the isolated perfused rat heart during ammonium chloride perfusion.—Cardiovasc. Res., 1975, 9, 295—301.
17. *Якушев В. С., Лифшиц Р. И., Слободин В. Б.* Эффект L-аспарагиновой кислоты при изопротереноловом некрозе сердечной мышцы. — Кардиология, 1972, 12, 12, 49—55.
18. *Saheki T., Katunuma N.* Analysis of regulatory factors for urea synthesis by isolated perfused rat liver. I. Urea synthesis with ammonia and glutamine as sources.—J. Biochem., 1975, 77, 3, 659—669.
19. *Kamin H., Handler Ph.* The metabolism of parenterally administered amino acids.—J. biol. Chem., 1951, 188, 1, 193—205.
20. *Chamalaum R. A., Tager J. M.* Nitrogen metabolism in the perfused rat liver.—Biochim. biophys. Acta, 1970, 222, 119—134.
21. *Igbal K., Ottaway J. H.* Glutamine synthetase in muscle and kidney.—Biochem. J., 1970, 119, 145—156.
22. *Ферусова Т. В., Фролькис Р. А.* Биохимия инфаркта миокарда. — Киев, 1976.
23. *Горкин В. З., Аюпян Ж. И., Веревкина Ю. Б. и др.* Дезаминирование биогенных аминов и других азотистых соединений в митохондриях печени. — Биохимия, 1970, 35, 140—145.
24. *Watanabe T.* Significance of ammonia in myocardial metabolism.—Jap. Circ. J., 1968, 32, 1811—1814.
25. *Ran E. E., Shine K. I., Gervais A., Douglas A. M., Amos III E.* Enhanced mechanical recovery of anoxic and ischemic myocardium by amino acid perfusion.—Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 1979, 5, 6, 873—879.
26. *Mendes-Murao J., McGivan J. D., Chappell J. B.* The effect of L-leucine on the synthesis of urea.—Biochem. J., 1975, 146, 457—464.
27. *McGivan J. D., Bradford N. M.* Inhibitory effect of some amino acids on stimulated urea synthesis in rat liver.—Biochem. J., 1973, 134, 209—215.
28. *Metz R., Salter J., Brunet G.* Effect of pyruvate and other substrates on urea synthesis.—Metabolism, 1968, 17, 158—167.
29. *Krebs H.* The role of chemical equilibria in organ function.—Adv. Enz. Regul., 1975, 13, 449—472.
30. *Gornall A. G., Hunter A. J.* The synthesis of urea in the liver with special reference to citrulline as an intermediant in ornithine cycle.—J. biol. Chem., 1943, 147, 593—602.
31. *Ratner S.* Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline.—Adv. Enz. Regul., 1954, 15, 319—383.
32. *Menne F., Kossmann K. T., Lange K.* Über die Entstehung von Jarnstoff im myocard.—Hop-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1963, 332, 314—316.

## МАКРОЭРГИЧЕСКИЕ ФОСФАТЫ И КОНТРОЛЬ ОБЪЕМА КЛЕТКИ ПРИ ЛЕТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Р. Д. ДЖЕННИНГС (R. B. JENNINGS), Х. К. ХОКИНС (H. K. HAWKINS),  
ДЖ. Э. ЛОУВ (J. E. LOWE), М. Л. ХИЛЛ (M. L. HILL),  
К. А. РАЙМЕР (K. A. REJMER) (США)

### ВВЕДЕНИЕ

Кратковременная глубокая ишемия, вызванная непосредственной окклюзией главной коронарной артерии у собак, обуславливает обратимое повреждение миоцитов левого желудочка сердца. Обратимость повреждения проявляется в том, что восстановление кровотока препятствует смерти клеток [1, 2]. Однако повреждение в субэндокардиальной области при глубокой ишемии становятся необратимыми при продолжительности ее более 40 мин. В это время восстановление артериального кровотока приводит к быстрому набуханию клеток, изменению поперечных градиентов, возникновению зон сокращения миофибрилл, аккумуляции Са в митохондриях и появлению разрушения в сарколемме [3—5].

Непосредственные причины перехода повреждений в необратимые неизвестны. Однако дефекты в регуляции обмена клеток, наблюдаемые при ишемии примерно в то же время, когда клетки проходят через «точку необратимости», позволяют предполагать, что изменение проницаемости или структуры сарколеммы может быть ранним признаком необратимого состояния [6]. К сожалению, проницаемость сарколеммы не может быть определена в зоне ишемии *in vivo* из-за невозможности введения маркеров транссарколеммальных потоков в области значительно зауженного кровотока. По этой причине нами был разработан метод определения *in vitro* способности ткани, поврежденной *in vivo*, поддерживать клеточный объем и исключать такие молекулы, как ионулы, которые в нормальных условиях остаются во внеклеточном пространстве [5—7]. Нами была также изучена ультраструктура ишемической ткани до и после инкубации с целью сопоставления наблюдаемых функциональных изменений со структурными признаками необратимых изменений.

Так как регуляция объема является активным процессом, требующим АТФ для поддержания активности Na, K-АТФ-азы в клеточной мембране, нами было также определено действие глубокой ишемии *in vivo* на содержание макроэргических фосфатов ( $\sim\text{PO}_4$ ) и суммарное содержание аденинуклеотидов ( $\Sigma\text{Ag}$ ) в ткани [1]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в зоне ишемии наблюдается быстрое и заметное расщепление  $\sim\text{PO}_4$ . Креатинфосфат (КФ) расщепляется на 75% в течение

60 с [8—10], затем наблюдается постепенное уменьшение АТФ [1, 8—11], сопровождающееся деградацией всех адениннуклеотидов. К моменту начала необратимых изменений остается менее чем 10% АТФ и клетки теряют способность поддерживать постоянный объем. В то же время увеличивается инульнируемое пространство (ИПП), что свидетельствует об увеличении проницаемости сарколеммы для больших молекул, и под электронным микроскопом можно наблюдать наличие структурных дефектов плазмолеммы. Патогенез мембранных дефектов и их отношение к расщеплению макроэргических фосфатов неизвестны. Однако как расщепление макроэргических фосфатов, так и мембранные дефекты являются ранними характеристиками необратимых повреждений и могут быть причиной гибели клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ишемическая ткань была получена от задней папиллярной мышцы (ЗПМ) левого желудочка собаки после 15, 30, 40, 60, 120 или 240 мин ишемии, индуцированной окклюзией огибающей артерии. Ишемическая ткань сравнивалась с неишемической тканью от передней папиллярной мышцы (ППМ) тех же животных. Специальные предосторожности (см. ниже) были применены для идентификации инфарктной зоны, в которую была включена только глубоко ишемическая ткань (коллатеральный кровоток меньше чем 15% от контроля) [12, 13].

ТАБЛИЦА 43

ПАРАМЕТРЫ, ИЗМЕРЕННЫЕ ПРИ ГЛУБОКОЙ ИШЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ *IN VIVO* В ЛЕВОМ ЖЕЛУДОЧКЕ СОБАКИ

ППМ (контроль)	ЗПМ					
	15	30	40	60	120	240
	мин					

1. Ультраструктура
2. СТВ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$
3. АТФ, АДФ, АМФ, КрФ и лактат
4. Функции среза *in vitro* при 37 °C за 60 мин;
  - а) ультраструктура
  - б) СТВ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$
  - в) АТФ
  - г) синтез КрФ
  - д) ИПП

В табл. 43 перечислены изученные параметры. После каждого периода ишемии измерялись уровень метаболитов и электролитов в ткани, суммарное содержание тканевой воды (СТВ) и изучалась ультраструктура клеток. Регуляция клеточного объема и про-

вищаемость сарколеммы определялись в срезах контрольной и ишемической тканей, инкубированных *in vitro* при 37°С в оксигенированной среде.

### Техника оперирования

В экспериментах было использовано 35 здоровых взрослых беспородных собак. Животные были анестезированы внутривенным введением пентобарбитала натрия, интубированы и вентилированы при помощи респираторного насоса «Харвард 607». Вентиляцию проводили при скорости 200 мл/мин на 1 кг воздухом, содержащим достаточно O<sub>2</sub> для поддержания PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> и pH на физиологическом уровне. Левая часть грудной клетки была вскрыта через небольшие разрезы в четвертом межреберье. После изолирования огибающей артерии на расстоянии 7—10 мм от ее начала у аорты артерию лигировали шелковым шпурком [14]. ЭКГ были записаны на II отведении на модели самописца «Brush 440». У всех животных наблюдались развитие цианоза в бассейне огибающей артерии и увеличение сегмента ST в отведениях II, III и aVF. После прохождения желаемого интервала ишемии ввели тиофлавин S, изолировали сердце и быстро довели до 5°С в охлажденном льдом изотоническом растворе KCl.

### Идентификация зоны глубокой ишемии при помощи тиофлавина

С этой целью ввели 10 мл свежеприготовленного 4% раствора красителя тиофлавина в течение одной и двух циркуляций (10—15 с) непосредственно перед изолированием сердца. Этот краситель связывается с эндотелиями сосудов при потоке выше 20% от контроля и ярко флюоресцирует в ультрафиолетовом свете. Зона глубокой ишемии идентифицировалась как нефлюоресцирующая область субэпикарда при визуализации ткани ультрафиолетовым светом в темном помещении. Легче всего идентификацию проводить с использованием желтого фильтра для осмотра сердца [15]. Если граница ишемической зоны доходила до вершины ППМ, ишемическая часть ППМ, идентифицированная как нефлюоресцирующая, была исключена из контрольного материала.

После 60, 120 и 240 мин ишемии глубокоишемическая необратимо поврежденная зона ЭПМ легко идентифицировалась по бледно-красной окраске без применения тиофлавина S. Глубокоишемические зоны ЭПМ и контрольная часть ППМ вырезали и помещали в охлажденный льдом раствор Krebs-рингер-фосфат (KRF) [6]. Тонкие срезы этих тканей вырезали лезвием вдоль оси миофибрилл для ультраструктурного анализа, определения метаболитов и регуляции объема клеток.



## Определение метаболитов

Для этого срезы ткани быстро взвешивали на микровесах «Сahn Model DTL» и помещали в охлажденный 3,6% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Взвешивание и перенос ткани обычно потребовали 10—15 с. После 60—180 мин экстракции срезы гомогенизировали в гомогенизаторе «Tri-R» и нейтрализовали  $K_2CO_3$  и  $KOH$ . Экстракты центрифугировали для удаления  $KClO_4$  и супернатант замораживали при  $-20^\circ C$ . В образцах в течение 2—3 нед ферментативными методами определяли лактат [17], АТФ [18], АДФ [19], АМФ [19] и глюкозо-6-фосфат (г-6-Ф) [18].

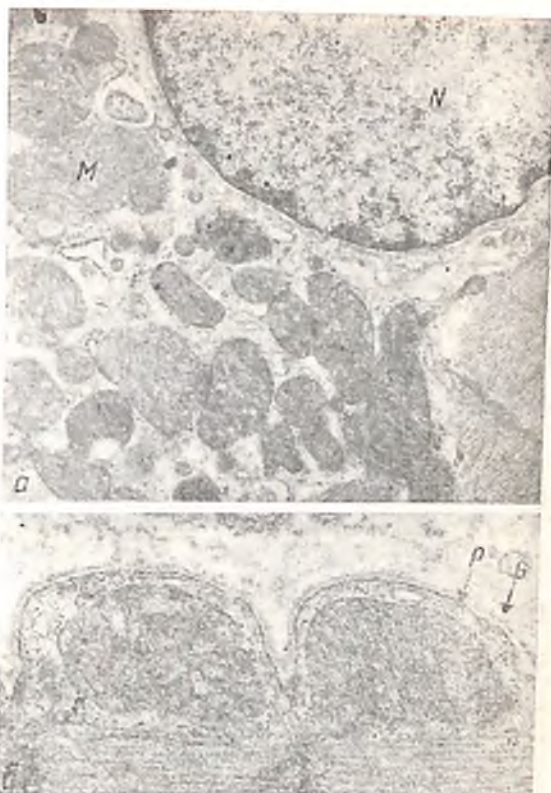
## Определение объема клеток и содержания электролитов

Контрольные срезы пенкубированной ткани быстро взвешивали на микровесах, помещали в освобожденные от ионов сцинтилляционные флаконы (мини-флаконы, «Corning») и высушивали при  $105^\circ C$ . Сухие срезы взвешивали еще раз и СТВ рассчитывали в миллилитрах на 100 г сухой массы ткани. Другие срезы инкубировали при  $37^\circ C$  в оксигенированном КРФ растворе в течение 60 мин. КРФ приготавливали непосредственно перед экспериментом, рН 7,2—7,4; раствор имел следующий состав (ммоль на 1 л):  $Na^+$  — 151,6;  $K^+$  — 4,81;  $Ca^{2+}$  — 1,29;  $Mg^{2+}$  — 1,20;  $SO_4^{2-}$  — 1,24;  $PO_4^{2-}$  — 15,63;  $Cl^-$  — 121,7. Для определения ИПП в инкубационную смесь добавляли следовые количества  $^{14}C$ -оксиметилинсулина. Смесь оксигенировали 100%  $O_2$  перед разливанием в колбы; в течение эксперимента колбы также газировали 100%  $O_2$ . Все колбы встряхивали в шейкере «Dubnoff» с частотой 180 раз в минуту. В 1 колбе Эрленмейера вместимостью 25 мл одновременно инкубировали при  $37^\circ C$  в 15 мл среды до 6 срезов массой 20—80 мг по сырой массе. После разных периодов инкубации срезы споласкивали быстро в 0,25 М сахарозе, излишек жидкости удаляли ватмановской фильтровальной бумагой, срезы взвешивали и высушивали, как указано выше.

Электролиты экстрагировали из высушенных срезов 5 мл 0,75 М  $HNO_3$  [1]. Ионы определяли после разведения экстрактов от 1 до 100 раз в свободной от ионов стеклянной посуде, которая не содержала обнаруживаемого натрия.  $RbCl$  (5000 частей на миллион) был добавлен как к экстрактам, так и к стандартам для выравнивания ионизации. Содержание электролитов определяли с использованием соответствующих стандартов в атомном абсорбционном спектрофотометре IL-351, снабженном компьютером «Tektronix» 31. Стандартные кривые для  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  и  $K^+$  были получены с использованием растворов, содержащих эти ионы в  $PO_4^{2-}$  в физиологических концентрациях [20].

Рис. 137. Ишемическая передняя папиллярная мышца.

а — внутриядерный хроматин (N) распределен равномерно. Митохондрий (M) клетки содержат мало плотных гранул. Гликоген присутствует, но слабо проявлен, как обычно происходит при фиксации тканью глутаральдегидом.  $\times 31\ 000$ ; б — плазматическая мембрана (P) и гликокаликс (G) типичны для контроля.  $\times 50\ 000$  (Печатается с разрешения J. of Pathology [1]).



Для расчета ИПП сухие срезы были регидратированы добавлением 1—2 капель деионизированной воды на флакон и растворены в содуе 350. Радиоактивность  $^{14}\text{C}$  была измерена в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Hewlett-Packard» [1, 7].

### Электронная микроскопия

Для каждого из четырех периодов ишемии блоки как с поверхности, так и из центра по крайней мере двух срезов до и после инкубации как ИПМ, так и ЗПМ вырезали в 4% растворе глутарового альдегида в 0,1 M какодилатном буфере. После 1—4 ч фиксации ткань обрабатывали осмием, дегидрировали в растворах этапола с повышающейся концентрацией, споласкивали в окиси пропилена и заключали в смолу Epon-812. В среднем тонкие срезы получали от трех блоков, окрашивали с толудином голубым и исследовали при помощи светового микроскопа. Для электронной микроскопии из каждого среза приготавливали ультратонкие срезы, окрашивали смесью уранилацетата и цитрата свинца и исследовали при помощи электронного микроскопа «Hitachi» HS-8.

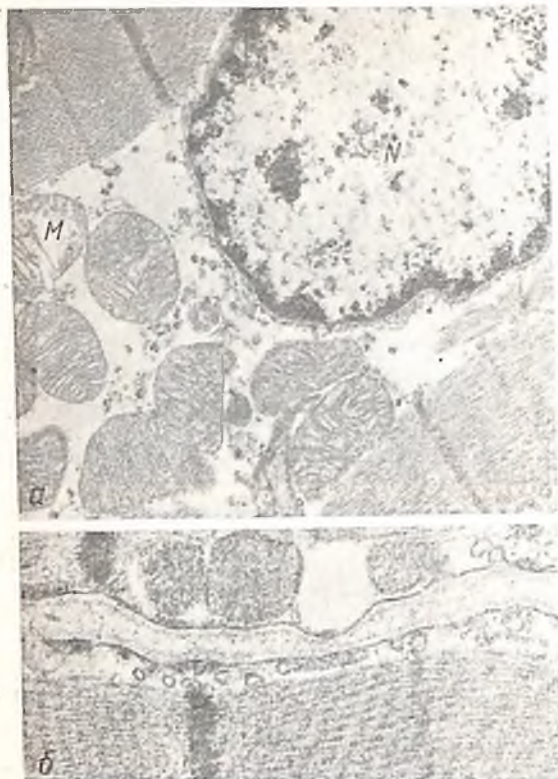


Рис. 138. Задняя папиллярная мышца после 15-минутной ишемии.

а — видно разграничение хроматина ядра (N) и слабое набухание митохондрий. Видна одна сильно набухшая митохондрия (M). Гликогена меньше, чем в контроле ( $\times 31\ 000$ ); б — сарколемма уплощена над расслабленными миофибриллами. Плазматическая мембрана и гликокаликс цитакты ( $\times 74\ 000$ ) (Печатается с разрешения J. of Pathology [1]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Изменения, происходящие в глубокоинфемизированной ткани

**Общие изменения.** Субэпикардальный слой бассейна огибающей артерии, включая ЗПМ, до 40 мин или более ишемии выглядел нормальным. Однако у 3 из 6 собак на 40-й минуте и у всех на 60-й минуте ишемии ткань в ЗПМ и внутренняя треть бассейна огибающей артерии были бледно-красными и жесткими. В этих же областях не наблюдалось флюоресценции. Таким образом, оба этих параметра могут использоваться для идентификации необратимо поврежденного миокарда.

**Ультраструктурные изменения.** Ультраструктурные характеристики миоцитов в центре свежеприготовленных срезов из неинфарктной части ППМ или ЗПМ после разных периодов ишемии сердца описаны ранее [16] и здесь будут рассмотрены кратко. Характерные особенности неинфарктного миокарда показаны на рис. 137. После 15 мин глубокой ишемии миоциты ЗПМ незначительно отличаются от контрольной ткани; наблюдаются только некоторые разграничения ядерного хроматина, случайное разрушение митохондрий и уменьшенное количество

Рис. 139. Задняя папиллярная мышца после 40-минутной ишемии.

а — заметное разграничение хроматина ядра (N) и набухание митохондрий (M) с появлением прозрачного матрикса и аморфных осадков в матриксе. Гликогена нет ( $\times 31\ 000$ ); б — разрывы в сарколемме при целом гликокаликсе. Митохондрии (M) набухшие ( $\times 38\ 000$ ). (Печатается с разрешения J. of Pathology [1]).

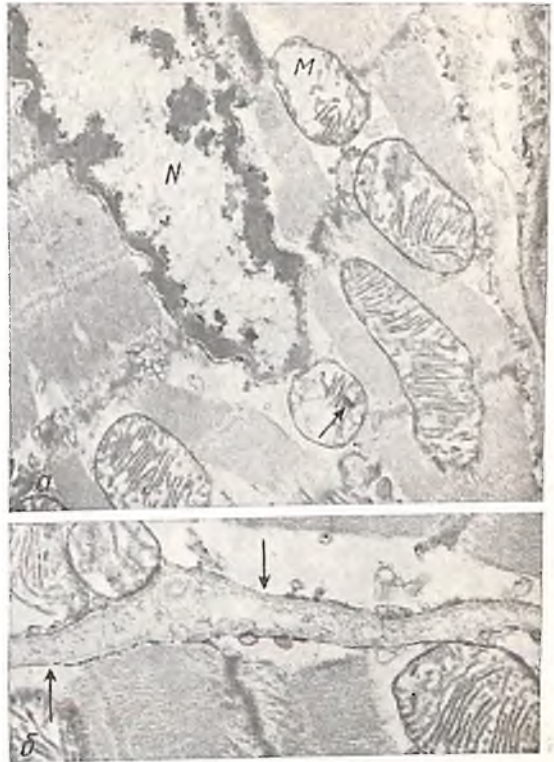


Рис. 140. Задняя папиллярная мышца после 40-минутной ишемии *in vivo* и 60-минутной инкубации. Инкубация приводила к исчезновению I-полос миофибрилл и расширению Z-полос. Митохондрии (M) набухшие и содержат аморфный осадок (а). Сарколемма субсарколеммального пузырька (B) соседней клетки разрушена. Видны циркулярные профили плазматической мембраны (стрелки) под оставшимся гликокаликсом ( $\times 31\ 000$ ). (Печатается с разрешения J. of Pathology [1]).

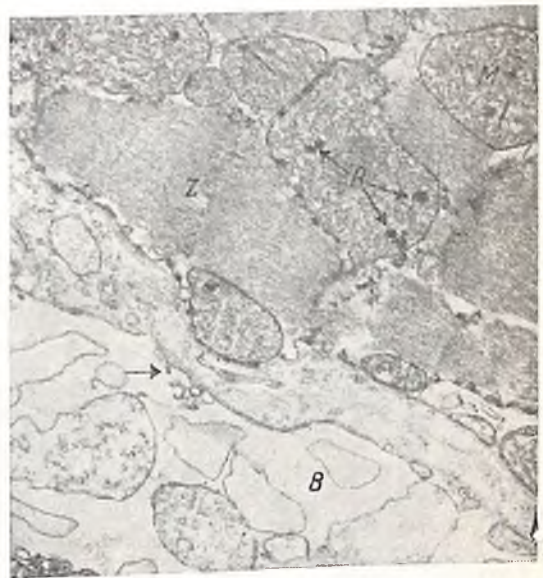
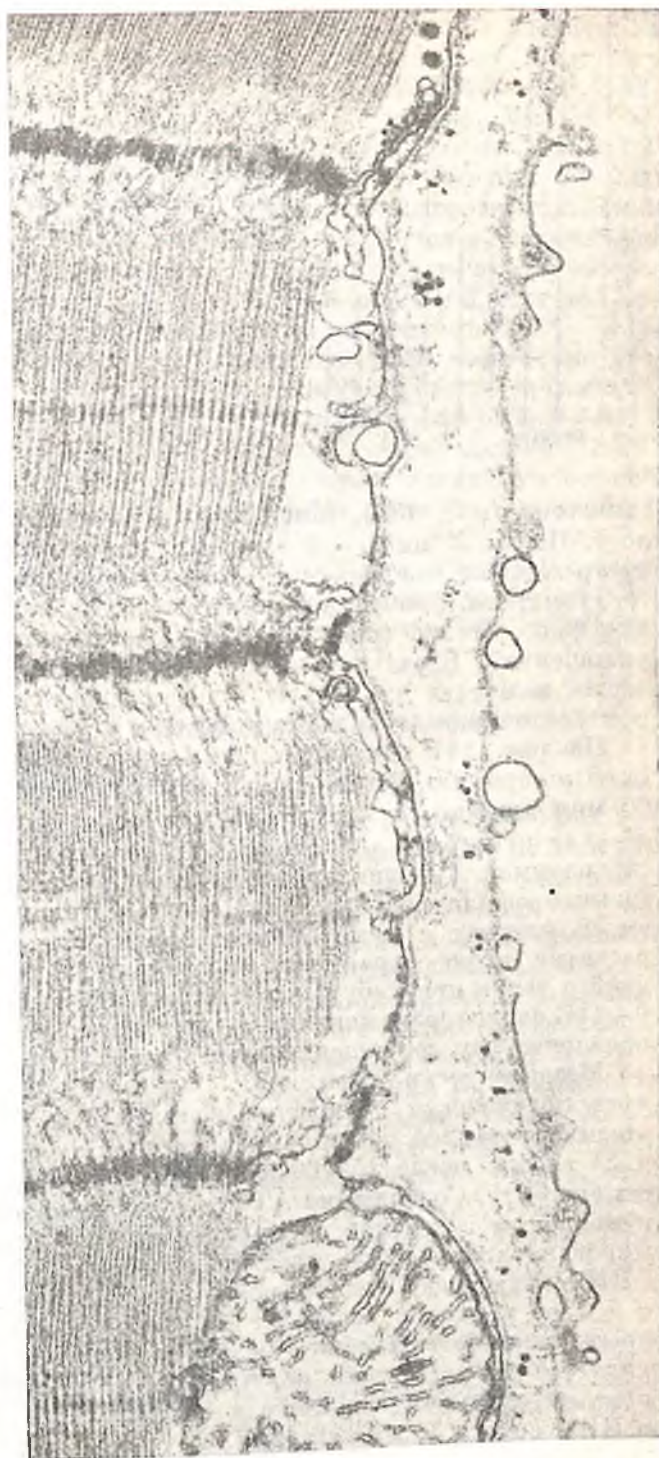




Рис. 141. Задняя папиллярная мышца (ЗПП) после 40-минутной ишемии у собаки, как и на рис. 139. Гликокаликс (G) интактен, трехслойная структура плазмалеммы под ним имеет разрывы (стрелки). Во внеклеточном пространстве виден коллаген ( $\times 108\ 000$ ).

Рис. 142. ЗПП после 60-минутной ишемии *in vivo* и 60-минутной инкубации при 0—1 °С. Видны пузырьки жидкости под сарколеммой; плазмолемма разорвана на циркулярные профили. Миофибриллы необратимо поврежденной клетки не сокращены ( $\times 75\ 000$ ).



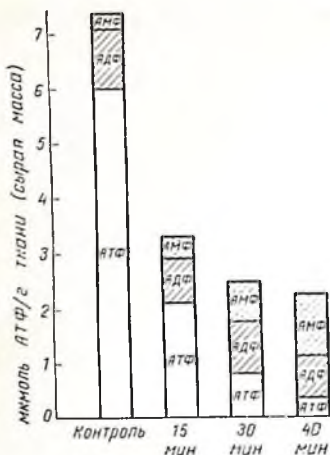


Рис. 143. Распределение адениннуклеотидов в контроле и после 15, 30 и 40-минутной ишемии *in vivo*. АТФ к 40-й минуте падает до 9%. Суммарное содержание адениннуклеотидов падает из-за деградации АМФ до аденозина, миезина, ксантина и гипоксантина [11, 12]. Уровни АДФ и АМФ выше, чем истинные уровни *in vivo* из-за метаболических реакций, протекающих во время отбора проб.

гликогена (рис. 138). Миофибриллы расслаблены и имеют I-полосу. После 30 мин — 4 ч ишемии изменения в миоцитах ЗПМ прогрессируют, наблюдаются более четкое разграничение ядерного хроматина, набухание митохондрий и образование в них аморфного осадка (рис. 139, 140). Сарколемма часто оказывается уплотненной. Базальный слой обычно интактен, но в плазматической мембране наблюдаются небольшие дефекты, возрастающие при увеличении длительности ишемии [1].

На рис. 141 показаны изменения, которые наблюдаются *in vitro* при инкубации срезов в тепле в течение 60 мин после 60 мин ишемии *in vivo*. Наиболее неожиданным являлось образование пузырьков сарколеммы, покрытых частично разорванной сарколеммой. Остатки плазматической мембраны видны как круговые профили под более или менее интактным базальным слоем. В клетках с мембранными дефектами наблюдалось также развитие полос сокращения миофибрилл. В сравнении с инкубацией в тепле при набухании поврежденных срезов на холоду при 0—1°С сарколемма менялась аналогичным образом (рис. 142), появления зон сокращения миофибрилл не наблюдалось.

**Метаболические изменения.** При глубокой ишемии к 30-й минуте практически полностью исчезает КФ. Содержание АТФ в ишемизированной и неишемизированной тканях было определено у 21 собаки после 15—60 мин глубокой ишемии (см. табл. 1 в ссылке [1]). Содержание АТФ в неишемизированной ИПМ было одинаковым в течение всего эксперимента, поэтому данные суммировали для расчета среднего значения. В ишемизированной ЗПМ наблюдалось прогрессивное уменьшение АТФ до 35, 16, 9 и 7% от контроля после 15, 30, 40 и 60 мин ишемического повреждения соответственно. В этих условиях анаэробный гликолиз является единственным источником макроэргических фосфатов, поэтому содержание лактата в ЗПМ было на 400% больше, чем в ИПМ спустя 30 мин ишемии.

Прогрессирующее уменьшение содержания АТФ в ишемизированной ткани связано с уменьшением суммарного пула аденинпуклеотидов. Распределение их измерялось у 12 собак (рис. 143). Контрольная ткань содержала  $7,41 \pm 0,27$  мкмоль  $\Sigma$ Ад на 1 г сырой массы, из которых 6,02 мкмоль приходилось на АТФ, 1,23 — на АДФ и 0,16 — на АМФ. После 15 мин ишемии  $\Sigma$ Ад уменьшились до 55% главным образом благодаря исчезновению 3,9 мкмоль АТФ без соответствующего увеличения содержания АДФ и АМФ. В действительности наблюдалось также некоторое уменьшение содержания АДФ. К 30-й или 40-й минуте  $\Sigma$ Ад уменьшилось еще больше, главным образом за счет АТФ. Содержание АДФ осталось низким. Количество АМФ постепенно увеличивается к 40-й минуте ишемии, достигая уровня, превышающего контрольный в 6 раз. Однако увеличение содержания АМФ соответствует только небольшой фракции расщепленного АТФ. По-видимому, расщепление суммарного пула аденинпуклеотидов объясняется их деградацией до аденозина, инозина, ксантина и гипоксантина [11, 21].

Отношение аденилатного заряда (ОАЗ)<sup>1</sup> в неишемизированной ткани составляло 0,90, но уменьшилось значительно до 0,76; 0,54 и 0,32 после 15, 30 и 40 мин ишемии соответственно (см. табл. 2 в ссылке [1]).

## Регуляция объема клетки и макроэргические фосфаты

### Характеристики контрольной ткани

Общие характеристики контроля объема клетки в срезах пиллярной мышцы, случайно выбранных в интервале 60 мин инкубации, показаны на рис. 144. В течение первых 5 мин инкубации наблюдается небольшое уменьшение содержания  $K^+$ , небольшое увеличение содержания  $Na^+$  в ткани и незначительное увеличение СТВ. Такой первоначальный поток электролитов, по-видимому, обусловлен потерей  $K^+$  из клеток на границе срезов, повышением в этих клетках уровня  $Na^+$  и некоторым увеличением межклеточного пространства. После таких изменений  $Na^+$ ,  $K^+$  и СТВ остаются постоянными в течение 60 мин инкубации. Содержание АТФ в срезе сначала тоже быстро падает более чем на 50%, возможно, из-за присутствия поврежденных клеток и АТФ-азной активности при приготовлении среза. После этого содержание АТФ в срезе осталось постоянным. Содержание  $K^+$  было исходно низким, но увеличивалось постепенно до 75—80% от значения, характерного для *in vivo*.

<sup>1</sup> ОАЗ =  $\frac{АТФ + 1/2 АДФ}{АТФ + АДФ + АМФ}$  соответствует доли аденинпуклеотидов, со-

держащих макроэргический фосфат. В нормальных клетках это отношение составляет 0,85—0,9. Если аденинпуклеотиды представлены только АТФ, то отношение равно 1,0, если АМФ—ОАЗ, то нулю.



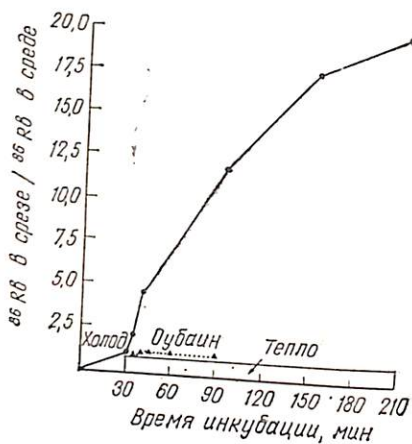
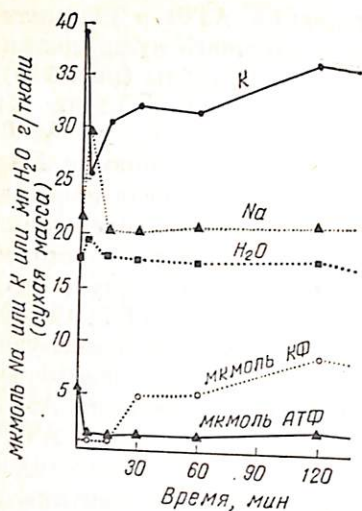


Рис. 144. Действие инкубации на содержание электролитов, воды и метаболитов в тонких срезах папиллярной мышцы. Срезы получены от одного и того же животного и инкубировались в растворе Кребса — Хензельянта при 37°C до 120 мин. Отдельные срезы удаляли после 5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин инкубации и анализированы. Исходные изменения обусловлены холодом, так как температура ткани при отборе срезов была 1–5°C. Синтез КФ заканчивался за 30 мин. После первоначального падения содержания АТФ осталось на постоянном уровне.

Рис. 145. Действие холодной инкубации на последующее накопление  $^{86}\text{Rb}$  в тонких срезах. Содержание  $^{86}\text{Rb}$  в 1 мл воды срезов сравнивали с концентрацией  $^{86}\text{Rb}$  в среде (отношение S/M). При 0°C это отношение составляет примерно 1,0. При активации метаболизма нагреванием до 37°C это отношение увеличивается благодаря аккумуляции Rb и K. Оубаин ингибирует накопление.

Сохранение объема клеток требует активного метаболизма. При охлаждении срезов нешемической ткани до 0–1°C в оксигенированном КРФ-растворе, что приводит к замедлению ферментативных реакций, наблюдается очень значительное увеличение СТВ и содержания  $\text{Na}^+$  и уменьшение содержания  $\text{K}^+$ . Восстановление метаболизма после нагревания холодных набухших срезов до 37°C сопровождается быстрым восстановлением ионных градиентов и нормального объема клетки. Кинетика реаккумуляции  $\text{K}^+$  изучалась также с использованием следовых количеств  $^{86}\text{Rb}^+$ , заменяющих  $\text{K}^+$ . К концу периода инкубации на холоду  $^{86}\text{Rb}$  уравновесился в СТФ так, что отношение его концентрации в срезе к той же в среде было 1,0. Восстановление метаболизма сопровождалось быстрым накоплением  $^{86}\text{Rb}$  в срезах ткани (рис. 145). Этот процесс целиком ингибируется оубанном, что показывает полную зависимость аккумуляции  $^{86}\text{Rb}$  и  $\text{K}^+$  от  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в клеточной мембране.

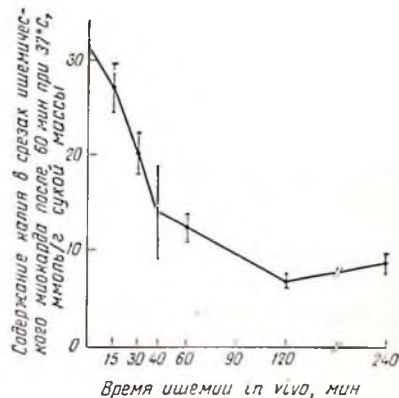
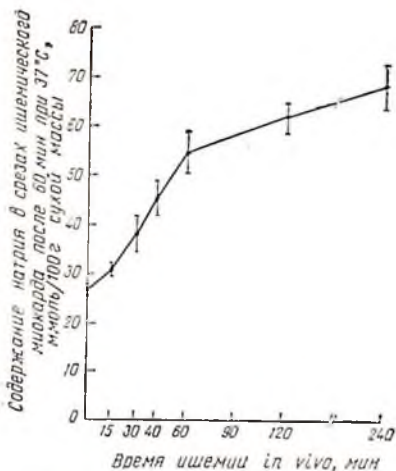


Рис. 146. Влияние различных сроков ишемии на содержание натрия в срезах миокарда, инкубированных в течение 60 мин при 37°C. При 0-минутной ишемии содержание натрия соответствует контрольному уровню в периемизированной передней папиллярной мышце тех же животных. Каждый из отмеченных периодов ишемии приводит к значительному увеличению содержания натрия наряду с увеличением общего количества воды в срезах (см. рис. 148).

Рис. 147. Влияние различных периодов ишемии на содержание калия в срезах, инкубированных в течение 60 мин при 37°C. При 0-минутной ишемии содержание калия соответствует контрольному уровню в периемизированной передней папиллярной мышце тех же животных. По сравнению с контрольным уровнем содержание калия в срезах значительно падает после каждого интервала ишемии.

Таким образом, срезы периемизированной капиллярной мышцы сохраняют контроль объема клетки в течение 3—4 ч благодаря активному метаболизму и работе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в клеточной мембране. Кроме того, ультраструктура клеток в срезах периемической ткани, инкубированной при 37°C в течение 60 мин (без или с исходным холодовым набуханием) была близка к ультраструктуре клеток контрольной ткани.

#### Контроль объема клеток в инкубированных срезах после ишемического повреждения in vivo

Содержание воды и электролитов в периемизированных срезах ЗПМ после 15, 30, 40 или 60 мин ишемии не отличалось от этих показателей в контрольных периемизированных ППМ. Даже после 120 и 240 мин ишемии СТВ и содержание  $\text{Na}^+$  увеличивались незначительно, а  $\text{K}^+$  незначительно уменьшилось: от  $43,3 \pm 1,8$  в контроле до  $36,5 \pm 1,5$  в ЗПМ. Однако в течение любого времени ишемии менялась способность поврежденной ткани поддерживать объем при последующей инкубации in vitro. Срезы, инкубированные после 15 мин ишемии in vivo, показали некоторое

увеличение содержания воды и  $\text{Na}^+$  и сопутствующее уменьшение количества  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Такие изменения возрастали с увеличением длительности ишемии. Спустя 60 мин ишемии или более инкубированные срезы были набухшими и концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  приближались к концентрациям этих ионов в окружающей среде (рис. 146, 147).

### **ИПП срезов инкубированной ткани, поврежденной временной ишемией**

Изменения в ИПП инкубированных срезов поврежденной ткани показаны на рис. 148. В течение ишемии менее чем 40 мин ИПП не меняется, однако после 40 мин ИПП значительно увеличивается. ИПП поврежденной ткани продолжало возрастать до максимального значения 300 мл на 100 г сухой массы, никогда не становилось равным СТВ.

Действие 60-минутной глубокой ишемии *in vivo* на СТВ и ИПП инкубированных срезов в разных условиях показано на рис. 149. В срезах ЗПМ, инкубированных при 37°С, имелись описанные изменения СТВ и ИПП. Одинаковая степень набухания наблюдалась как для неишемической (контрольной), так и для поврежденной тканей при инкубации при 0°С, но при холодовом набухании ИПП контрольной ткани не увеличивалось. При последующей тепловой инкубации объем контрольной ткани восстановился при неизменном ИПП. В отличие от этого объем поврежденной ткани не восстановился при тепловой инкубации и ИПП продолжала увеличиваться.

### **Изменения содержания АТФ и КФ в инкубированных срезах после ишемии**

Прогрессирующее исчезновение регуляции клеточного объема в срезах ишемизированной ткани (см. рис. 146—148) связано с увеличением расщепления АТФ *in vivo* и с прогрессирующей неспособностью ткани ресинтезировать КФ (см. рис. 1 и 2 в ссылке [1]). Некоторое количество КФ синтезировалось в тканях после 15 и 30 мин ишемии *in vivo*, но на 40-й минуте, когда 70—80% миоцитов было необратимо повреждено [1], у 3 из 5 собак не наблюдалось синтеза КФ. На 60-й минуте ишемии, когда почти все миоциты были повреждены необратимо, при инкубации срезов вообще не наблюдалось синтеза КФ.

### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Проведенные эксперименты показывают, что суммарное содержание аденинуклеотидов падает быстро и значительно в глобокишемизированном миокарде. К 15-й минуте содержание АТФ уменьшается до 65% и к 40-й минуте остается на уровне

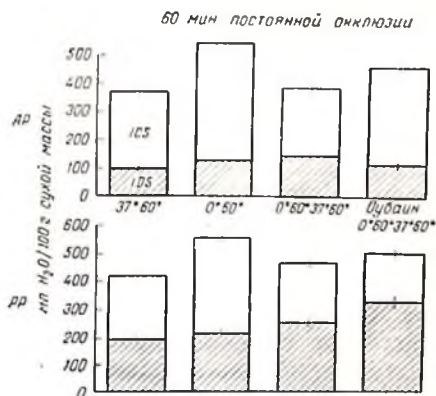
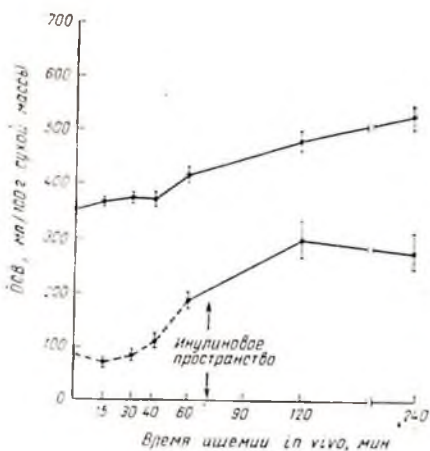


Рис. 148. Общее содержание воды (ОСВ) и инулиновое пространство в срезах миокарда при различных интервалах ишемии *in vivo*. При 0-минутной ишемии результаты анализа соответствуют контрольному уровню, полученному на срезах неишемизированного миокарда тех же животных. При всех интервалах ишемии от 40 мин и дольше отмечается значительное увеличение инулинового пространства.

Рис. 149. Диаграмма, показывающая распределение воды в контрольном миокарде передней папиллярной мышцы (AP) и поврежденной задней папиллярной мышцы (PP) у 4 собак. ICS — внутриклеточное пространство; IDS — инулиновое пространство. Высота каждого столбца обозначает общее содержание воды в ткани. После инкубации контрольного миокарда при 0°C в течение 60 мин отмечается сильное увеличение ICS при постоянном уровне IDS. Возобновление метаболизма приводит к почти полной ликвидации внутриклеточного отека в результате изгнания почти всей лишней внутриклеточной воды. Оубани ингибирует этот процесс. В миокарде, поврежденном в результате 60-минутной ишемии *in vivo*, также отмечается увеличение ICS в течение холодной инкубации и некоторое уменьшение внутриклеточного отека под влиянием последующей теплой инкубации. Однако IDS поврежденного миокарда было больше при всех условиях по сравнению с IDS контрольного миокарда. Этот результат говорит о том, что инулин растворяется в воде, в которой он до этого не был, т. е. проникает в ICS через сарколемму. Те же результаты можно теоретически объяснить и увеличением межклеточного отека; это, однако, не подтверждается ультраструктурными исследованиями. Следует отметить, что IDS никогда не становится равным общему количеству воды, что, возможно, происходит потому, что инулин все-таки не проникает в некоторые внутриклеточные органеллы, например такие, как митохондрии.

ниже 10%. Уменьшение содержания АТФ сопровождается небольшим увеличением количества АДФ и повышением содержания АМФ на 600%. Однако такое увеличение уровня АМФ соответствует только небольшой фракции исчезнувших аденин-циклеотидов. Хотя и ранее наблюдалось быстрое уменьшение содержания АТФ при ишемии или аноксии [10, 12], эти изменения не были столь значительными, как отмеченные в данной работе. Выявленное в этой работе более значительное расщепле-

ние АТФ несомненно является результатом улучшения техники отбора проб; использование тиофлавина S обеспечивает отбор чистых образцов ишемизированной ткани с небольшим загрязнением нормальной тканью. Сильное разрушение  $\Sigma$ Ад наблюдалось ранее [9, 10, 11, 21, 22], но не обсуждалось. Частично уменьшение  $\Sigma$ Ад обусловлено деградацией АМФ-5'-нуклеотидазой клеточной мембраны до аденозина с дальнейшей его деградацией до инозина, гипоксантина и ксантина [9, 11, 21—24]. Уменьшение содержания адениннуклеотидов может быть практически полностью объяснено эквивалентным увеличением уровня этих метаболитов (неопубликованные данные). Синтез адениннуклеотидов не может происходить в ишемизированной ткани и медленно протекает в оксигенированной ткани [25—27]. Поэтому даже кратковременная обратимая ишемия приводит к заметному и относительно устойчивому расщеплению адениннуклеотидов.

### Отношение макроэргических фосфатов к изменению ионных градиентов и ультраструктуры

Внезапная глубокая ишемия связана с быстрой (в течение секунд) аккумуляцией протонов, активацией анаэробного гликолиза, расщеплением гликогена, накоплением лактата, ацилкарнитина, потерей КФ, АДФ и АМФ [28—31]. Эти изменения развиваются во времени и хорошо выражены к 15-й минуте ишемии. Тем не менее в этот момент ишемические повреждения еще обратимы. Ультраструктура (в том числе сарколеммы) остается интактной, за исключением того, что наблюдаются потеря гликогена, расслабление миофибрилл и другие небольшие изменения. Инкубация срезов ЗПм в этот период приводит к небольшому увеличению СТВ и уменьшению ионных градиентов. Таким образом, миокардиальные клетки с уровнем АТФ, соответствующим 2,12 мкмоль на 1 г сырой ткани, сохраняют интактный объем и структуру. Восстановление артериального кровотока *in vivo* связано с восстановлением сократительной функции и предотвращением некроза [2, 4]. Это означает, что сердечная клетка переносит потерю 65% АТФ и в этих условиях сохраняет сократительную функцию [1] *in vivo*. Восстановление функции кажется независимым от общего ресинтеза АТФ, так как суммарное содержание тканевого АТФ остается низким в течение 24 ч после восстановления кровотока (неопубликованные данные). 2,12 мкмоль АТФ на 1 г сырой ткани соответствует концентрации АТФ 2,8 мМ во внутриклеточной жидкости (ВКЖ) (такой расчет основывается на предположении, что весь АТФ доступен для поддержания функции клетки и что тканевый АТФ представляет собой АТФ миоцитов). Так как в ишемической области не во всех клетках одновременно наступают необратимые повреждения, невозможно точно рассчитать концентрацию АТФ, связанную с переходом повреждений в необратимые. Однако на 60-й минуте,

когда все миоциты ишемической зоны погибли, внутриклеточная концентрация АТФ равна примерно 0,55 ммоль на 1 ВКЖ, и на 40-й минуте, когда 72% клеток погибли, она равна 0,65 ммоль/л (табл. 44). Таким образом, ишемическая гибель клетки в этой

ТАБЛИЦА 44

РАСЧЕТ ВКУТРИКЛЕТОЧНОГО АТФ \*

Ишемия, мин	АТФ, ммоль/100 г сухой массы	СТВ	ИПП	ВКЖ	ММ АТФ в ВКЖ
		мл/100 г сухой массы			
0	2,8	345,5	83,7	261,8	10,6
15	1,06	264,8	83,7	281,1	3,8
40	0,19	370,0	83,7	286,3	0,65
60	0,19	425,5	83,7	341,8	0,55

\* Данные взяты из табл. 2 и 3 ссылки [1]. Средние значения ИПП в ИППМ в контроле у 21 собаки были  $83,7 \pm 3,94$  мл на 100 г сухой массы. В контроле использовали 21 собаку и 5, 35 и 4 собаки — соответственно в опытах с ишемией продолжительностью 15, 40 и 60 мин. При расчете концентрации АТФ ИПП принимали постоянным и равным  $83,7$  мл/100 г сухой массы, так как увеличение ИПП в среде после необратимого повреждения *in vivo* обусловлено скорее всего проникновением инулина в ВКЖ, а не увеличением внеклеточного объема жидкости, на что указывает набухание клеток. Расчет АТФ основан на предположении, что измеренный АТФ представляет собой АТФ миоцитов.

модели связана с уровнем АТФ, меньшим чем 8% от контроля, или с его рассчитанной концентрацией менее чем 0,7 мМ. Средняя концентрация АТФ в ВКЖ, равная 0,55 мМ и наблюдаемая на 60-й минуте ишемии, близка к  $K_m$  для многих внутриклеточных ферментов, использующих АТФ [32]. Поэтому возможно, что дефицит АТФ является одной из важнейших причин недостаточности ионных градиентов [33]. Однако нарушение ионных градиентов на 40-й и 60-й минутах (см. рис. 146, 147) наблюдается также одновременно с появлением ультраструктурных характеристик необратимости (см. рис. 139). Существенно то, что ко времени полной гибели клеток исчезают все ионные градиенты. Поэтому трудно отделить действия дефицита АТФ на ионные градиенты от влияния дефектов в сарколемме (см. рис. 139—142). Дефекты сарколеммы могут обуславливать обратную утечку ионов и разрушения ионных градиентов даже при полной сохранности функции Na-K-насоса.

### Изменения сарколеммы

Хотя нарушения сарколеммы явные, их присутствие должно интерпретироваться осторожно. Например, небольшие дефекты могут являться артефактами, обусловленными повреждением миоцитозных пузырьков. Поэтому необходимо наличие четкого среза с явной трехслойной структурой мембраны с обеих сторон поврежденной мембраны (см. рис. 141), чтобы эти нарушения

могли быть рассмотрены как изменения в структуре самой сарколеммы. Нужно учитывать и возможность того, что нарушения мембраны являются дефектом фиксации. Однако нарушения сарколеммы всегда наблюдаются в клетках, в которых имеются другие ультраструктурные признаки необратимости. Развитие нарушений мембраны в необратимо поврежденной ткани при набуханиях срезов на холоду является дальнейшим свидетельством того, что сарколемма ишемически поврежденной клетки отличается от контрольной. Даже если миоциты ЗПМ и ППМ набухают одинаково, сарколемма разрушается только в ишемических клетках, но остается интактной в контрольных. Развитие зон сокращения миофибрилл и накопления Са в митохондриях в необратимо поврежденной ткани или при реперфузии *in vivo* или при инкубации срезов показывает далее, что сарколемма этих клеток неспособна препятствовать массивному потоку Са в клетки из внеклеточного пространства.

Изменения в ИПП срезов, поврежденных ишемией *in vivo* и инкубированных *in vitro* при 37° С, также весьма явны. Так как инулин находится во внеклеточном пространстве, разница между СТФ и ИПП представляет собой объем внутриклеточной жидкости. С учетом этого можно заключить, что параллельное увеличение СТВ и ИПП при возрастающей длительности ишемии (см. рис. 148) указывает на постоянство внутриклеточного объема и увеличение внеклеточного объема жидкости. Однако ультраструктурные данные свидетельствуют о внутриклеточной природе набухания. Нами был сделан вывод, что инулин в этих условиях проникает во внутриклеточное пространство, прежде для него недоступное. В отличие от этого контрольные миоциты после холодого набухания не показывают увеличения ИПП (см. рис. 149). Таким образом, несколько линий доказательств указывают на то, что необратимые ишемические нарушения связаны с изменениями структуры и функции мембраны. Патогенез их не известен.

#### Отношение между расщеплением адениннуклеотидов и гибелью клеток

Результаты данной работы свидетельствуют о тесной связи между расщеплением адениннуклеотидов и необратимым повреждением миоцитов. Еще не установлено, имеется ли между ними причинно-следственная связь. Однако вполне возможно, что отсутствие реакций, поддерживаемых АТФ, обуславливает развитие необратимости повреждений. Концентрация АТФ в ткани после 40 и 60 мин ишемии ниже  $K_m$  для АТФ во многих внутриклеточных реакциях [32]. Если оставшийся АТФ в саркоплазме может быть даже ниже 0,5 мМ. Поэтому в момент наступления необратимого состояния в клетках имеется низкая концентрация АТФ, недо-

статочная для поддержания скорости многих реакций. Можно предположить, что дефекты мембраны развиваются, если уровень АТФ слишком мал для реакций фосфорилирования.

С другой стороны, в ишемических клетках протекает множество реакций, независимых от АТФ, которые также могут обуславливать необратимость повреждений. В число этих реакций может входить накопление ацилкарнитина, который может действовать как детергент на мембрану [31], или накопление протонов, вызывающее депатурацию ферментов. Поэтому гипотеза о том, что расщепление АТФ или других макроэргических фосфатов является причиной необратимого состояния, не доказана. Расщепление АТФ не во всех тканях является показателем необратимых изменений [34, 35]. Независимо от этого как низкое содержание АТФ, так и изменения сарколеммы являются ранними показателями того, что клетки ишемически поврежденного миокарда прошли «точку необратимости».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jennings R. B., Hawkins H. K., Lowe J. E. et al. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog.—Am. J. Path., 1978, 92, 187—214.
2. Jennings R. B., Sommers H., Smyth G. A. et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.—Arch. Path., 1960, 70, 68—78.
3. Whalen D. A., Hamilton D. G., Ganote C. E., Jennings R. B. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells.—I. Effects on cell volume regulation.—Am. J. Path., 1974, 74, 381—398.
4. Kloner R. A., Ganote C. E., Whalen D., Jennings R. B. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow.—Am. J. Path., 1974, 74, 399—422.
5. Jennings R. B. Cell volume regulation in acute myocardial ischemic injury.—Acta med. scand., 1976, Suppl. 587, 83—93.
6. Ganote C. E., Jennings R. B., Hill M. L., Grochowski E. C. Experimental myocardial ischemic injury. II. Effect of *in vivo* ischemia on dog heart slice function *in vitro*.—J. Mol. Cell. Cardiol., 1976, 8, 89—204.
7. Grochowski E. C., Ganote C. E., Hill M. L., Jennings R. B. Experimental myocardial ischemic injury. I. A comparison of Stadie—Riggs and free-hand slicing techniques on tissue ultrastructure, water and electrolytes during *in vitro* incubation.—J. Mol. Cell. Cardiol., 1976, 8, 173—188.
8. Braasch W., Gudbjarnason W., Puri P. S. et al. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs.—Circulat. Res., 1963, 23, 429—438.
9. Jones C. E., Thomas J. X., Parker J. C., Parker R. C. Acute changes in high energy phosphates; nucleotide derivatives and contractile force in ischaemic and non-ischaemic canine myocardium following coronary occlusion.—Cardiovasc. Res., 1976, 10, 276—282.
10. Allison T. B., Ramey C. A., Holsinger J. W., Jr. Transmural gradients of left ventricular tissue metabolites after circumflex artery ligation in dogs.—J. Mol. cell. Cardiol., 1977, 9, 837—852.
11. Parker J. C., Jones C. E., Thomas J. Jr. Effect of ischemia and infarction on regional content of adneine nucleotides and derivatives in canine left ventricle.—Cardiology, 1976, 61, 279—288.
12. Kloner R. A., Reimer K. A., Jennings R. B. Distribution of collateral flow in acute myocardial ischemic injury.—Effect of propranolol therapy.—Cardiovasc. Res., 1976, 10, 81—90.



13. Reimer K. A., Jennings R. B. The wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death II.—*Lab. Invest.*, 1979, 40, 633—644.
14. Jennings R. B., Wartman W. B., Zudyk Z. E. Production of an area of homogeneous myocardial infarction in dog.—*Arch. Path.*, 1957, 63, 580—585.
15. Kloner R. A., Ganote C. E., Reimer K. A., Jennings R. B. Distribution of coronary arterial flow in acute myocardial ischemia.—*Arch. Path.*, 1975, 99, 86—94.
16. Jennings R. B., Ganote C. E. Structural changes in myocardium during acute ischemia. Proc. Joint US-USSR Symposium, Ponte Vedra, Fla, Nov. 1973.—*Circulat. Res. (Suppl. III)*, 1974, 35, 156—172.
17. Lowry O. H., Passoneua J. R. A Flexible System of Enzymatic Analysis.—New York: Acad Press, 1972, p. 194—201.
18. Lamprecht W., Trautschold I. Determination of ATP with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.—In: *Methods of Enzymatic Analysis* /Ed. H. V. Bergmeyer. New York: Acad. Press, Inc., 1974, p. 2101—2110.
19. Jawouk D., Gruber W., Bergmeyer H. V. Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate.—In: *Methods of Enzymatic Analysis* /Ed. H. V. Bergmeyer. New York: Acad. Press, Inc., 1974, p. 2127—2131.
20. Jennings R. B., Moore C. B., Shen A. C., Herdson P. B. Electrolytes of damaged myocardial mitochondria.—*Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1970, 135, 515—522.
21. Thomas R. A., Rubio R., Berne R. M. Comparison of the adenine nucleotide metabolism of dog atrial and ventricular myocardium.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1975, 7, 115—123.
22. Imai S., Riley A. L., Berne R. M. Effect of icheemia on adenine nucleotides in cardiac and skeletal muscle.—*Circulat. Res.*, 1964, 15, 443—450.
23. Gerlach E., Deuticke B., Dreisbach R. H. De Nucleotid-Abbau ber Sauer stoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die coronarydurchbluting.—*Naturwissenschaften*, 1963, 50, 228—229.
24. Benson L. S., Euvans G. T., Hallaway B. E. et al. Myocardial creatine phosphate and nucleotides in anoxic arrest and recovery.—*Am. J. Physiol.*, 1961, 201, 687—693.
25. Reibel D. K., Rovetto M. J. Myocardial ATP synthesis and mechanical function following oxygen deficiency.—*Am. J. Physiol.*, 1978, 234, H620—H624.
26. Berne R. M., Rubio R. Adenine nucleotide metabolism in the heart.—*Circulat. Res.*, Suppl. III, 1974, 25, 109—118.
27. Zimmer H. G., Trendelenberg C., Kammermeier H., Gerlach E. De novo synthesis of myocardial adenine nucleotides in the rat. Acceleration during recovery from oxygen deficiency.—*Circulat. Res.*, 1973, 32, 635—642.
28. Williamson J. R. Glycolytic cotrol mechanism. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic anoxic transition in perfused rat heart.—*J. biol. Chem.*, 1966, 241, 5025—5036.
29. Wollenberger A., Krause E. Metabolic characteristics of the acutely ischemic myocardium.—*Am. J. Cardiol.*, 1968, 22, 349.
30. Jennings R. B. Early phase of myocardial ischemic injury and infarction.—*Am. J. Cardiol.*, 1969, 24, 753—765.
31. Idell-Wenger J. A., Neely J. R. Effects of ischemia on myocardial fatty acid oxidation.—In: *Pathophysiology and Therapeutics of Myocardial Ischemia* /Eds. A. M. Lefer, G. Kelliher, M. Rovetto. New York: Spectrum Publication, Inc. 1977, p. 227—238.
32. Decker K. Quantitative aspects of biochemical mechanisms leading to cell death.—In: *Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis* /Ed. D. Klep- per. Baltimore. In press.
33. Hoffman J. E. Ionic transport across the plasma membrane. Cell. membra- nes.—In: *Biochemistry, Cell Biology and Pathology* /Eds. G. Wessman, R. Claiborne. New York Hospital Practice, 1975, p. 95—103.
34. Kleihues P., Kobayashi K., Hassman K. Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia.—*J. Neurochem.*, 1974, 23, 417—425.

35. Kleihues P., Hassman K., Pegg A. E. et al. Resuscitation of the monkey brain after one hour of complete ischemia. III. Indications of metabolic recovery.—Brain, Res., 1975, 95, 61—73.
36. Jennings R. B., Lowe J. E., Hawkins H. K., Reimer K. A. Ultrastructural changes in acute myocardial ischemic injury.—In: Brain and Heart Infarct II /Ed. R. J. Zülch. In press, 1979. J. F. Bergman Verlag, Munich, FRG.

УДК 616.127-005.4-036.17-07:616.127-018.1.008.6-07

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕФЕКТОВ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ГЛУБОКОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛА С ПОМОЩЬЮ КОЛЛОИДНОГО ЛАНТАНА

В. Р. ШАРОВ (СССР), Р. Б. ДЖЕННИНГС (R. B. JENNINGS),  
Х. К. ХОКИНС (H. K. HAWKINS), (США),  
Ю. М. СЕЛЕЗНЕВ, А. В. МАРТЫНОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Работы последних лет показывают, что любое повреждение сократительной клетки сопровождается изменением проницаемости ее мембран. Этот феномен был вначале обнаружен на уровне световой микроскопии как наличие плазматических протеинов в цитоплазме погибших мышечных клеток [1—3]. В дальнейшем улучшение техники электронно-микроскопических трэйсеров позволило обнаружить более ранние нарушения проницаемости плазматических мембран этих клеток [4—6]. Показано [7], что при 3½-часовом экспериментальном инфаркте миокарда в околоинфарктной зоне появляются кардиомиоциты без видимых ультраструктурных изменений, сарколемма которых, однако, уже достаточно повреждена для проникновения коллоидных частиц  $\text{La}(\text{OH})_3$  в их саркоплазму. Авторы отмечают одновременное присутствие здесь значительно измененных клеток, в которых, однако, сарколемма выглядела достаточно сохранной — коллоидный лантан не проникал через плазмалеммальный барьер. Впервые обнаружено [8], что токсические дозы  $\beta$ -адренергических катехоламинов (изопротеренол и норэпинефрин) приводят к раннему изменению проницаемости сарколеммы кардиомиоцитов. По данным этих авторов, пероксидаза проникала в саркоплазму даже тех клеток, которые не имели видимых ультраструктурных альтераций, в то время как в контрольном материале весь белок локализовался только экстрацеллюлярно. В связи с этим можно предположить, что клетки околоинфарктной зоны при экспериментальном инфаркте миокарда, имеющие признаки раннего изменения проницаемости сарколеммы [7], были подвержены дей-

ствию повышенных доз  $\beta$ -адренергических катехоламинов. Плазматические мембраны других клеток по неизвестным причинам остаются резистентными к воздействию этих биогенных аминов.

В настоящей работе была предпринята попытка определить, зависит ли характер повреждения проницаемости мембран кардиомиоцитов от природы повреждающего фактора. С этой целью проведено сравнительное исследование дефектов проницаемости мембран сократительных клеток сердца при «кальциевых» некрозах миокарда и некроза, возникающих в очаге глубокой ишемии при экспериментальном инфаркте миокарда.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве электронно-микроскопического трейсера применялся лантан. Это токсичный металл, который может быть использован только на фиксированной ткани, что, разумеется, ограничивает сферу его применения. Тем не менее его выбор был обусловлен тем, что из всех известных электронно-микроскопических маркеров самым мелким является коллоидный лантан. Средний диаметр коллоидной частицы  $\text{La}(\text{OH})_3$  равен 2 нм [9], что намного меньше, чем размеры прижизненных трейсеров: диаметр ферритиновой частицы 10—20 нм, пероксидазы — 3,5—4 нм, цитохрома С — 3 нм [9—12]. Сравнительное исследование материала при разных воздействиях позволило отвлечься от возможных артефактов, связанных с применением токсичного трейсера, так как эти артефакты при одинаковой обработке должны быть сходны в сопоставляемых тканях. Наиболее важным моментом в данном исследовании являлась констатация максимально ранних дефектов мембранной проницаемости, и в этой ситуации коллоидный лантан выглядит предпочтительнее.

Коллоидный лантан готовили из  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  по методу, предложенному Revel и Karnovsky [13]. Окончательная фиксирующая смесь состояла из 1% свежеприготовленного  $\text{La}(\text{OH})_3$  (рН 7,8) и 4% забуференного какодилатом натрия глутарового альдегида (рН 7,4).

Экспериментальный инфаркт миокарда вызывали у крупных беспородных собак путем перевязки огибающей ветви левой коронарной артерии [14]. Через 0, 15 и 40 мин после ее перевязки из задней и передней папиллярных мышц вручную острыми бритвами изготовляли тонкие срезы ткани толщиной около 0,1—0,3 мм вдоль направления волокон [15]. Часть из них подвергали немедленной фиксации, оставшиеся срезы перед фиксацией инкубировали 30 мин в оксигенированном растворе Кребса — Рингера при 37°С [16, 17]. Кальциевые некрозы миокарда вызывали у крыс породы Вистар массой 150—200 г подкожным введением изопротеренола в дозе 30 мг/кг. Забой животных производили через 1 и 6 ч после инъекции, обрабатывали и исследовали папиллярные мышцы левых желудочков сердца.

Миокард фиксировали с лантаном в течение ночи при постоянном перемешивании, быстро обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в эпон-812 [18]. Часть материала после глутаральдегидной фиксации с лантаном дофиксировали в забуференной осмиевой кислоте, не содержащей лантана [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИИ

Варианты, связанные с наличием или отсутствием постфиксации миокарда осмиевой кислотой, не внесли принципиальных изменений в результаты данных исследований. Через 15 мин глубокой ишемии весь коллоидный лантан, как и в контроле, был локализован вне пределов саркоплазмы (рис. 150). Частицы коллоида проникали в кардиомиоциты лишь после 40 мин глубокой ишемии, т. е. при наступлении в клетках ранних необратимых изменений. Во многих кардиомиоцитах обнаруживалась аккумуляция лантана в фокальных порциях саркоплазмы над миофибриллами, что приводило к окрашиванию их с разной интенсивностью в различных клетках и даже в пределах одной клетки (рис. 151). Внутренние перегородки митохондрий контрастировались лантаном лишь в тех местах, где можно было видеть интенсивное скопление коллоида над миофибриллами. В митохондриальном матриксе и просвете цистерн саркоплазматического ретикулума осадков коллоидного лантана обнаружено не было: 30-минутная инкубация срезов ткани после 15-минутной ишемии, как и контрольных срезов, не изменяла картину распределения лантана в миокарде. Весь коллоид оставался вне пределов саркоплазмы (рис. 152). В то же время 30-минутная инкубация срезов ишемизированного в течение 40 мин миокарда приводила к появлению в матриксе митохондрий и просвете цистерн саркоплазматического ретикулума некоторых клеток крупных электронно-плотных скоплений коллоидного лантана (рис. 153).

Коллоидный лантан не проникал в саркоплазму кардиомиоцитов контрольных крыс. Весь  $\text{La}(\text{OH})_3$  можно было видеть как электронно-плотный гомогенный или гранулированный осадок, локализованный по поверхности сарколеммы или ее дериватов (рис. 154). Через 1 ч после введения изопроterenоло около половины внешне не измененных или мало измененных кардиомиоцитов содержали в своей саркоплазме частицы  $\text{La}(\text{OH})_3$ , которые располагались в основном вокруг наружных мембран митохондрий и по внешней поверхности липидных капель (рис. 155). Через 6 ч после инъекции препарата сарколеммы большинства внешне не измененных или мало измененных сократительных клеток становились проницаемыми для коллоидного лантана. Кардиомиоциты с самыми начальными признаками лизиса миофибрилл все без исключения содержали в своей саркоплазме  $\text{La}(\text{OH})_3$ ; с внешней поверхности сарколеммы коллоид при этом исчезал



Рис. 150. Кардиомиоциты собаки после 15-минутной глубокой ишемии. Коллоидный лаптан расположен вне пределов саркоплазмы, в основном в просвете вставочного диска (Вд),  $\times 15\,000$ .

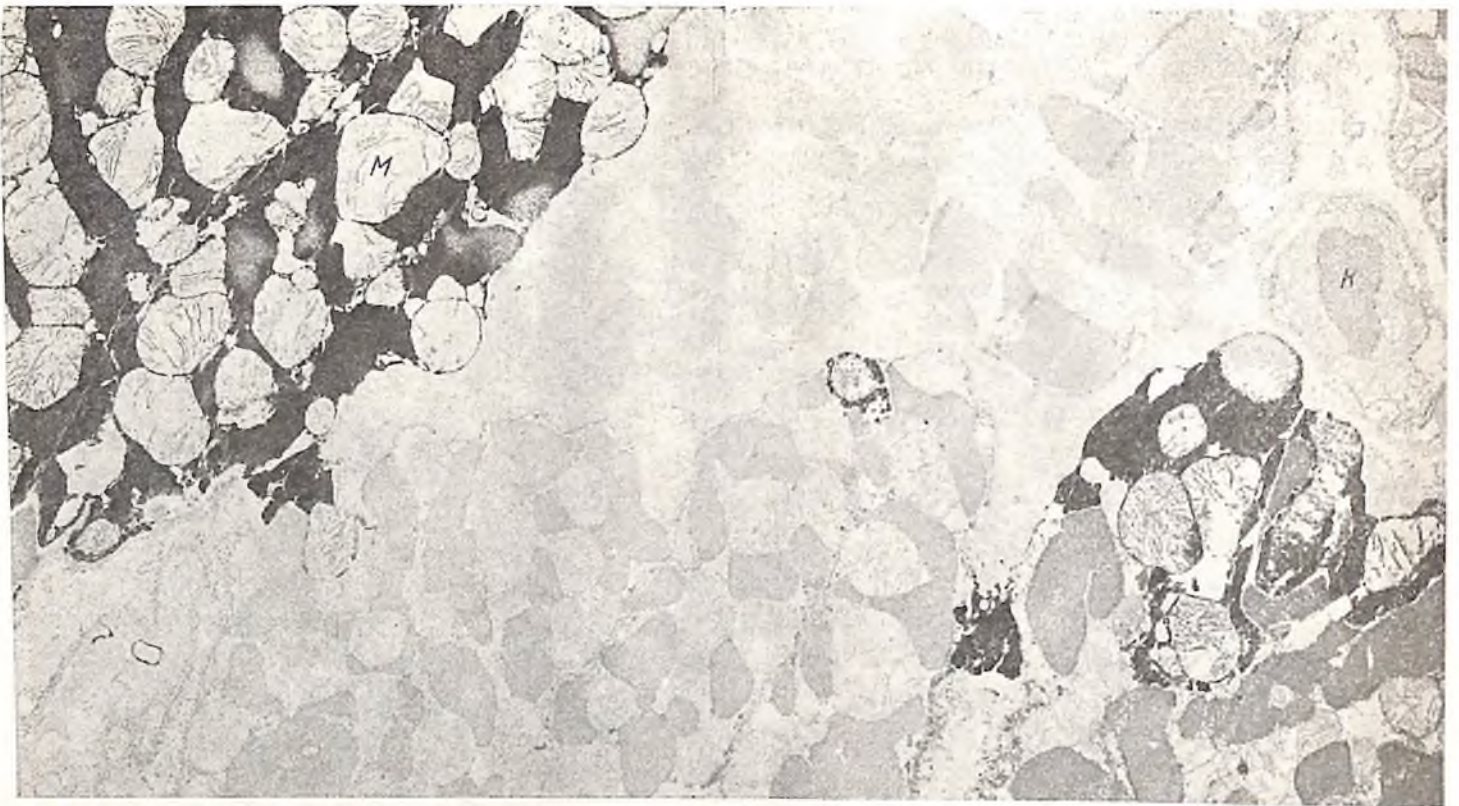


Рис. 151. Кардиомиоциты собаки после 40-минутной глубокой ишемии. Коллоидный лаптан проникает через сарколемму, окрашивая с разной интенсивностью миофибриллы и мембраны митохондрий (М), оставаясь за пределами их матрикса. К — просвет капилляра.  $\times 10\,000$ .

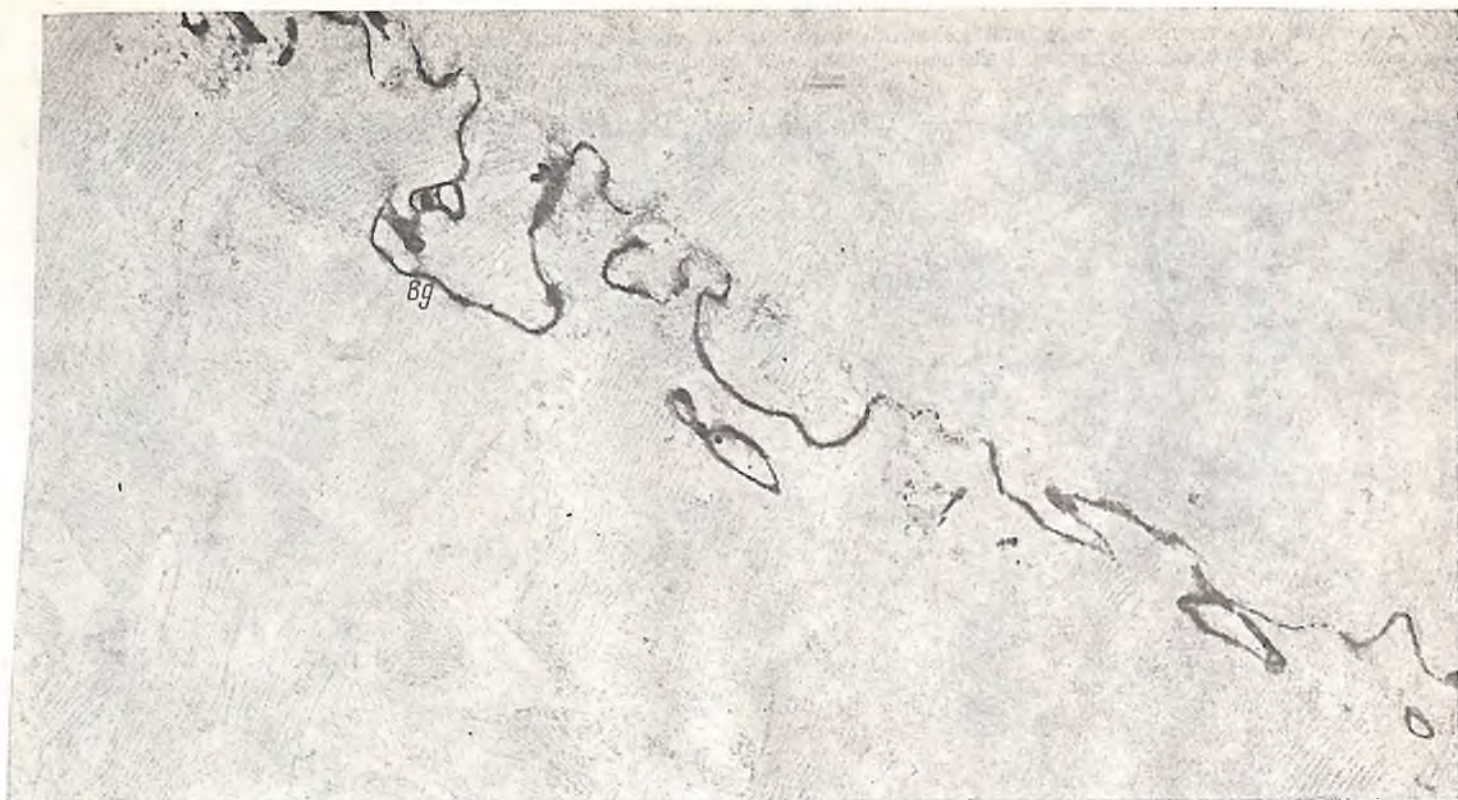


Рис. 152. Кардиомиоцит собаки после 15-минутной глубокой ишемии *in vivo* и последующей 30-минутной инкубации *in vitro*. Коллоидный лаптан остается за пределами саркоплазмы, в основном в просвете вставочного диска (Вд).  $\times 15\ 000$ .

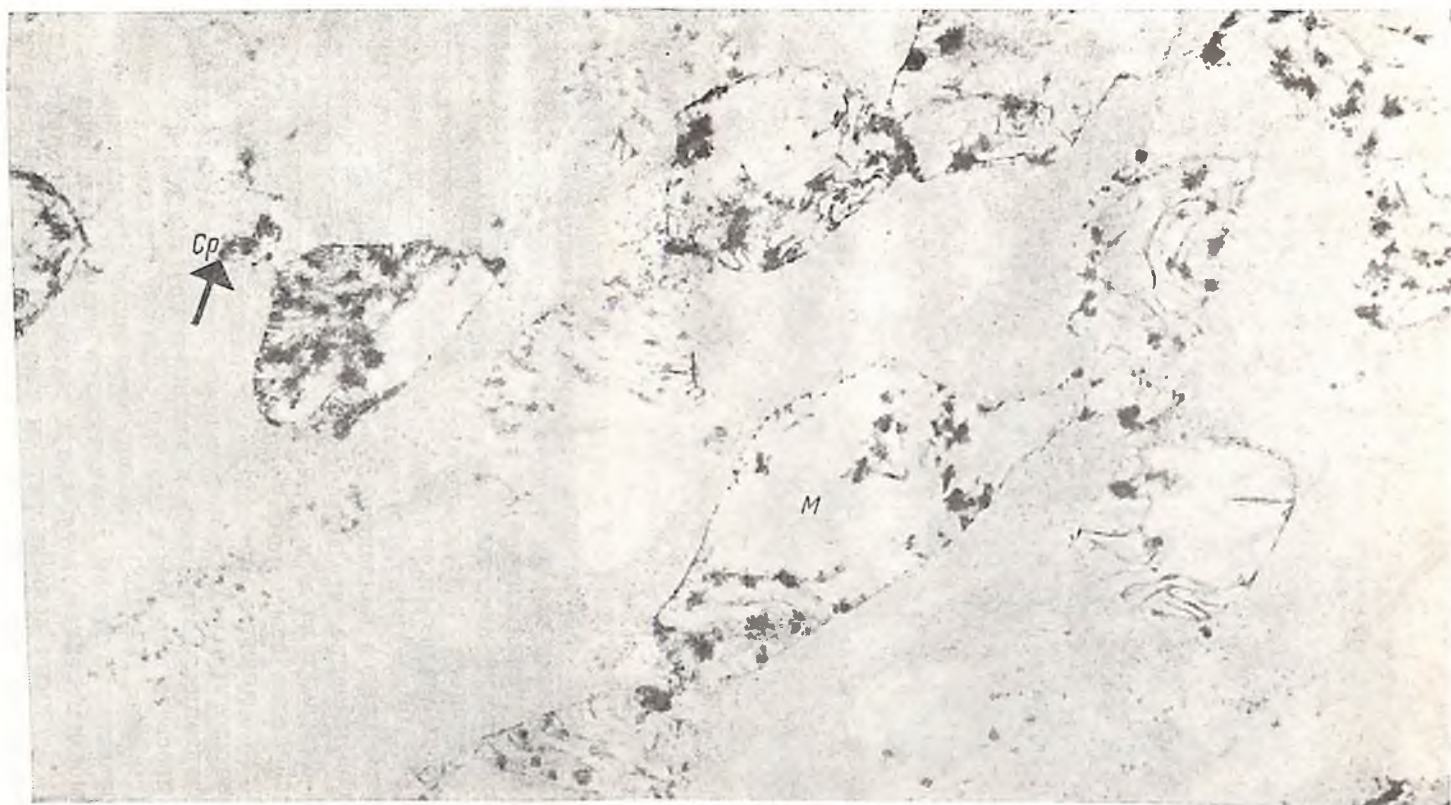


Рис. 153. Кардиомиоцит собаки после 40-минутной глубокой ишемии *in vivo* и последующей 30-минутной инкубации *in vitro*. Коллоидный лаптан обнаруживается в матриксе митохондрий (М) и просвете саркоплазматического ретикулума (Ср) — отмечено стрелкой.  $\times 30\ 000$ .

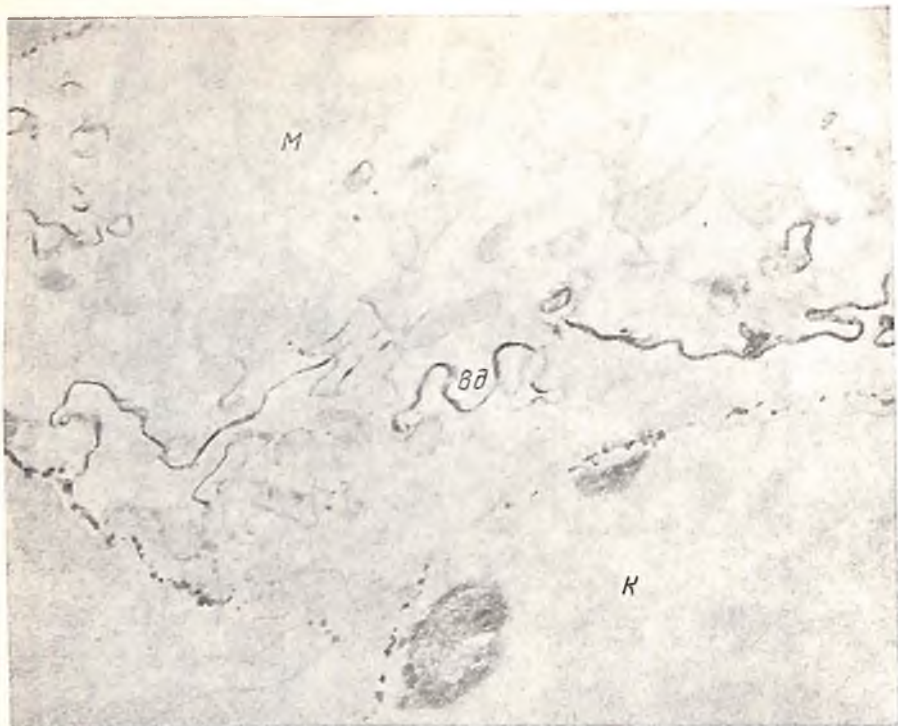


Рис. 154. Кардиомиоциты контрольных крыс. Коллоидный лантан локализован вне пределов саркоплазмы в просвете вставочных дисков (Вд) и в межклеточных щелях. М — митохондрия, К — просвет капилляра.  $\times 25\,000$ .

(рис. 156). В таких клетках при глутаральдегидной фиксации и без последующей дофиксациии материала осмиевой кислотой электронно-плотные осадки вокруг митохондрий отсутствовали. С целью исключения случайной гистохимической реакции, зависящей от осмиевой кислоты, проведена идентификация электронно-плотных осадков в этих клетках. Электронно-микроскопический «кевекс»-анализ подтвердил наличие в них лантана (см. рис. 156, а). По-видимому, осмиевая кислота способствует лишь закреплению осадка коллоидного лантана в клетке и предотвращает его вымывание, что происходит при одиночной глутаральдегидной фиксации во время обезвоживания и заливки материала. В необратимо измененных кардиомиоцитах, содержащих волокна пересокращения миофибрилл и разорванные саркомеры, электронно-плотные осадки коллоидного лантана, независимо от способа фиксации, появлялись в матриксе почти всех митохондрий и в просвете некоторых цистерн саркоплазматического ретикулула (см. рис. 157, 158). Внешне не измененные клетки, в которых коллоидный лантан локализовался вокруг митохондрий, и необратимо измененные клетки, где матрикс митохондрий был заполнен крупными конгломератами частиц  $\text{La}(\text{OH})_3$ , часто располагались рядом (рис. 159).

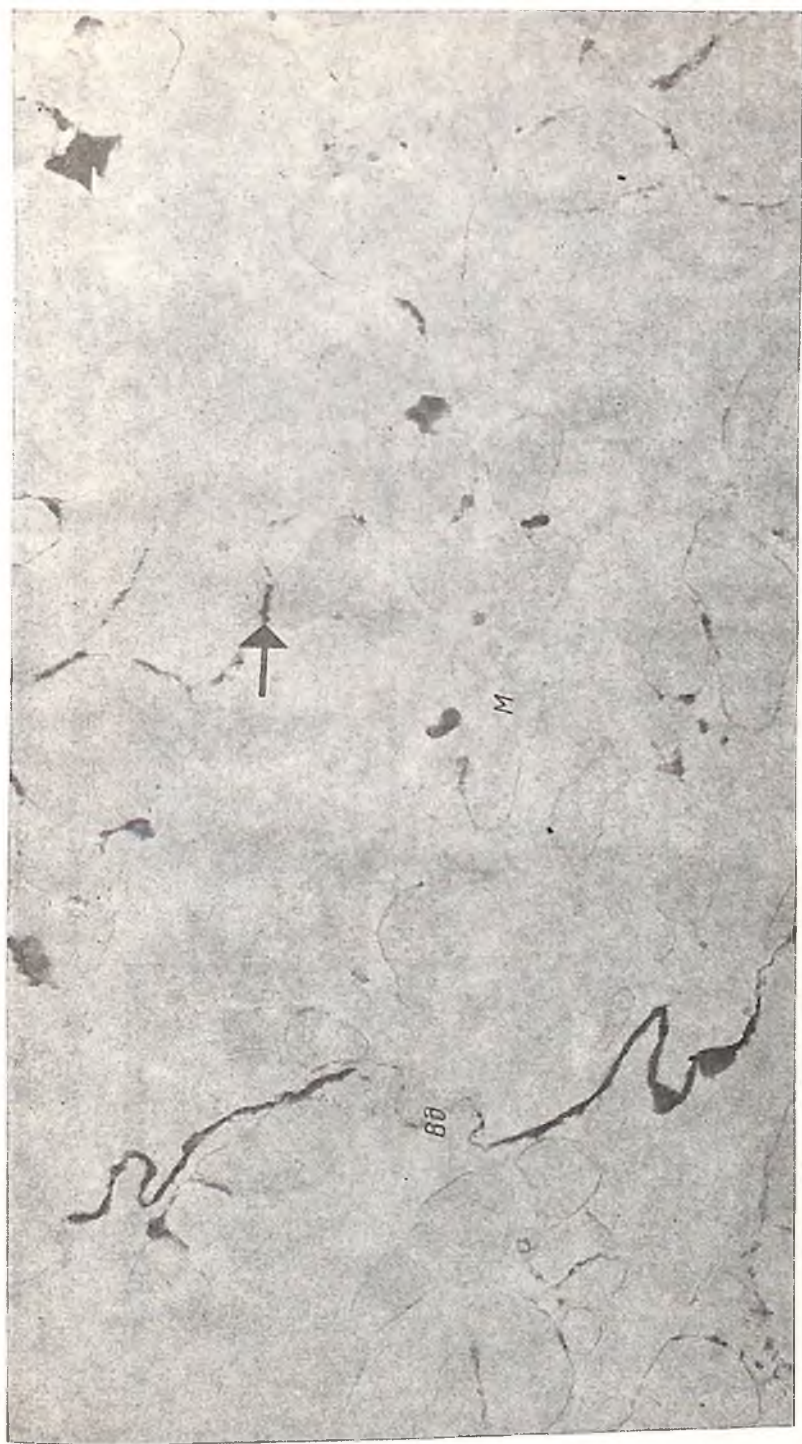


Рис. 155. Кардиомиоциты сердца крыс через час после введения изопротеренола. Коллоидный лантан обнаруживается в просвете вставочных дисков (Вд) и в саркоплазме клеток в тесном контакте с внешней мембраной митохондрий (М) — отмечено стрелкой и на границе липидных капель (Л). X25 000.



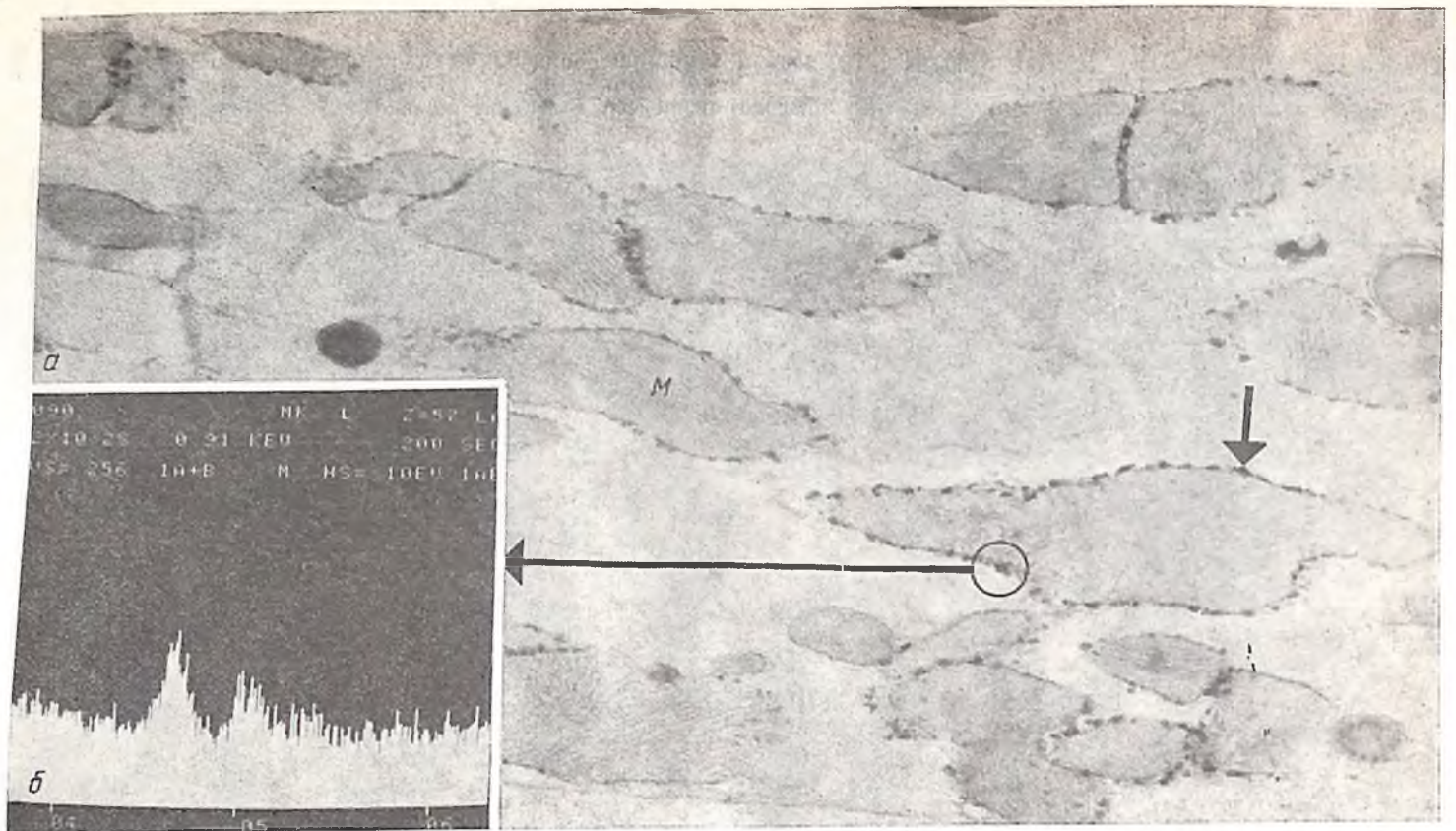


Рис. 156. Кардиомиоцит сердца крысы с признаками начинающегося лизиса миофибрилл через 6 ч после введения изопротеренола.

а — все митохондрии окружены осадком коллоидного лантана — отмечено стрелкой, с пограничной мембраны клеток коллоид исчезает; М — митохондрия.  $\times 30\ 000$ ; б — электронно-микроскопический элементарный «Кевекс» — анализ электронно-плотного осадка, расположенного в тесном контакте с митохондриями клетки, изображенной на рис. а. Зафиксированные пики соответствуют лантану.

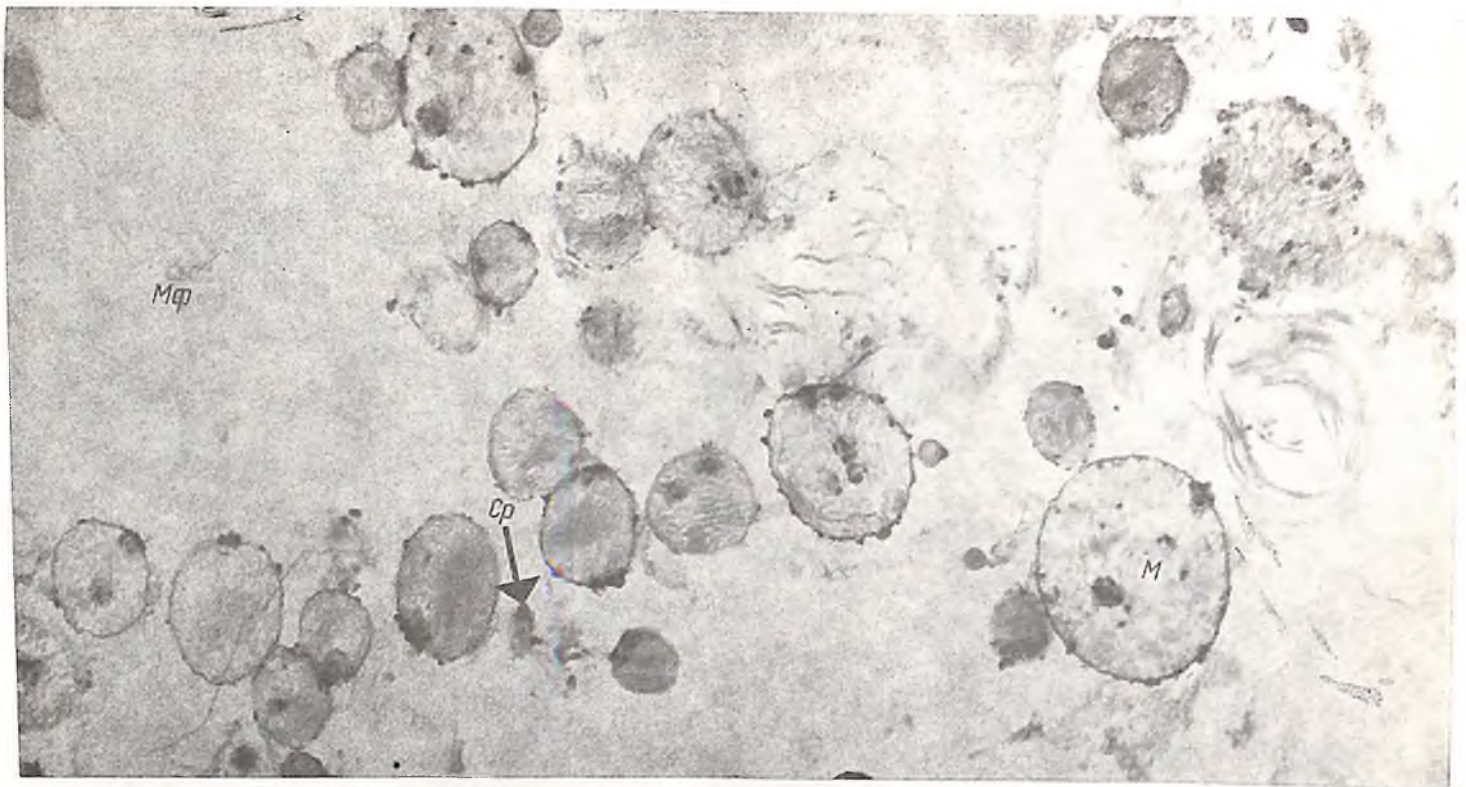


Рис. 157. Необратимо измененный кардиомиоцит сердца крысы через 6 ч после инъекции изопротеренола. В матриксе всех митохондрий (М) и в просвете саркоплазматического ретикулума (Ср) видны осадки коллоидного лантана — отмечено стрелкой. Мф — миофибриллы,  $\times 30\ 000$ .

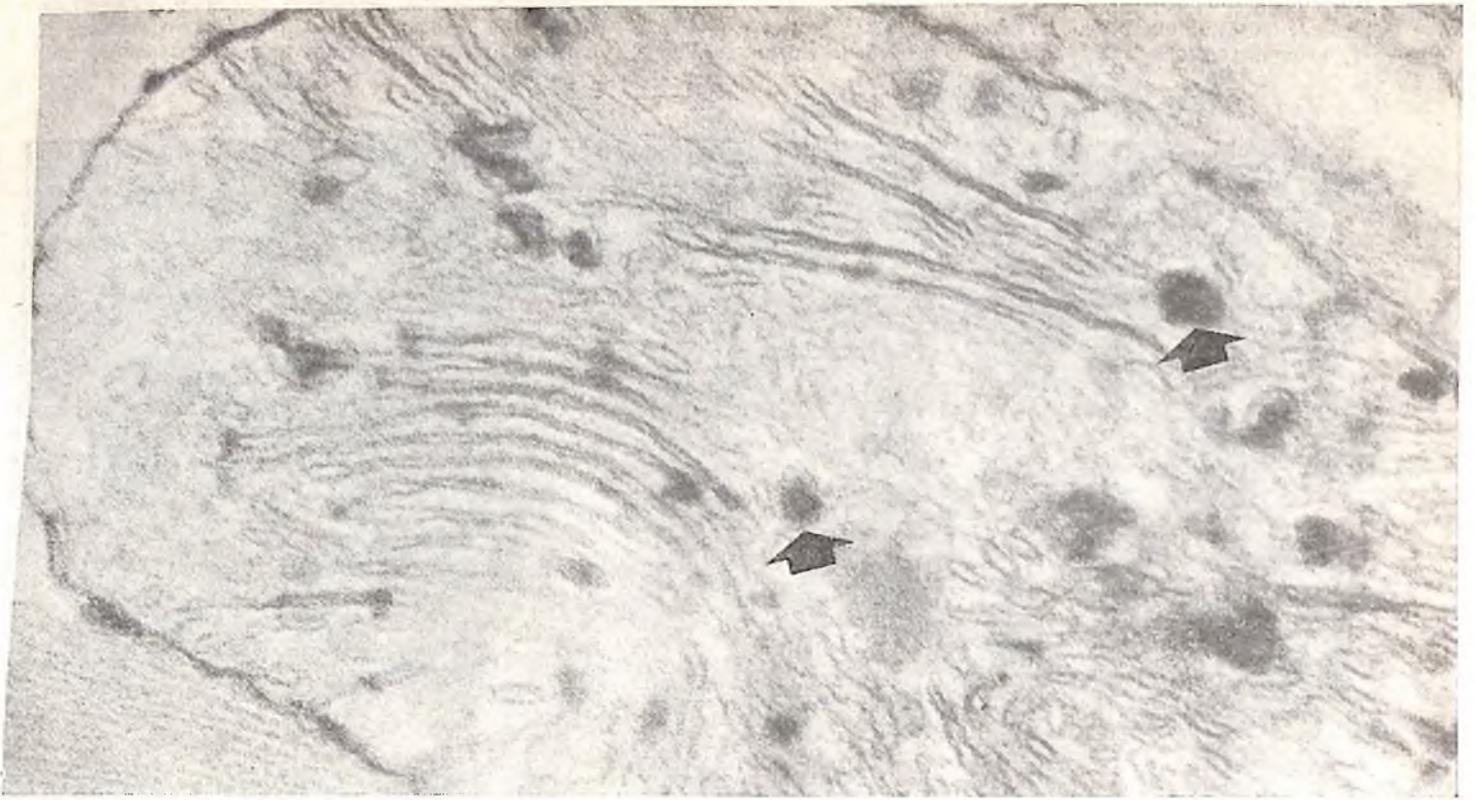


Рис. 158. Митохондрия из необратимо измененной клетки сердца крысы через 6 ч после введения изопротеренола. Можно видеть осадки  $\text{La}(\text{OH})_3$  в матриксе органеллы—отмечено стрелкой.  $\times 150\ 000$ .

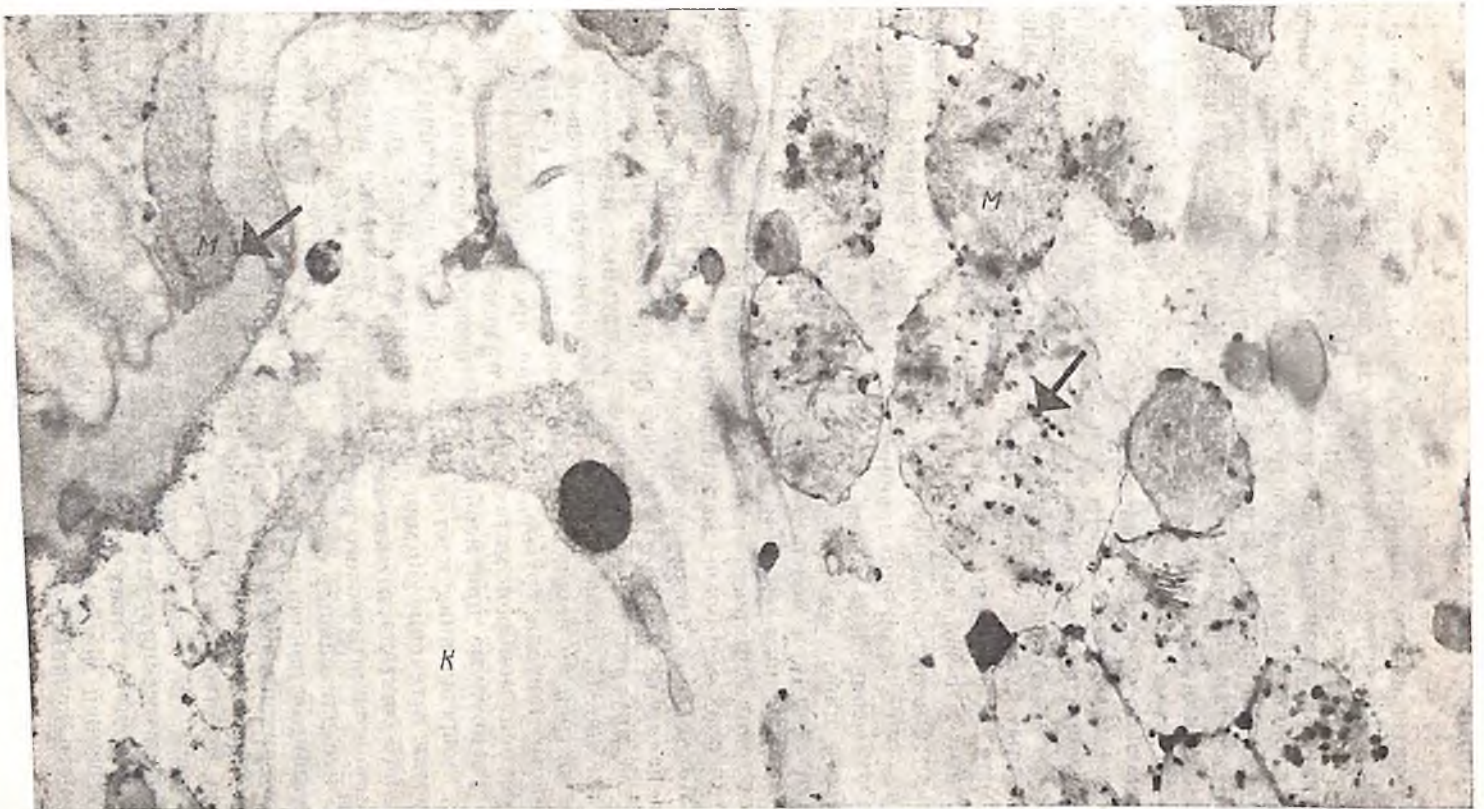


Рис. 159. Мало измененный и необратимо измененный кардиомиоциты сердца крысы через 6 ч после инъекции изопротеренола.

М — митохондрии, К — просвет капилляра. Стрелками обозначены осадки коллоидного лантана в мало измененной клетке вне митохондриального матрикса и в необратимо измененной клетке в матриксе митохондрии.  $\times 25\ 000$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы показывают, что независимо от природы повреждающего фактора проницаемость сарколеммы нарушается раньше, чем других мембран клетки. Однако при ишемическом воздействии в плазматической мембране появляются 2 нм поры лишь при наступлении необратимых изменений в кардиомиоцитах, в то время как под влиянием изопротеренола частицы коллоидного лантана начинают проникать в саркоплазму даже не измененных или мало измененных клеток.

Как известно, токсическое действие изопротеренола с самого начала связано с неконтролируемым инфлюксом внешнего Са внутрь кардиомиоцитов [20]. Для возникновения предпосылок подобного нарушения обмена Са в условиях глубокой ишемии требуется 40-минутное воздействие — только в необратимо ишемизированных клетках в сарколемме возникают дефекты, достаточные для неконтролируемого проникновения внешнего Са в саркоплазму, что показано в экспериментах с реперфузией предварительно ишемизированного миокарда [21]. Создается впечатление, что момент проникновения коллоидного лантана внутрь саркоплазмы совпадает с моментом появления неконтролируемого кальциевого инфлюкса или пор в сарколемме, достаточных для его реализации при соответствующих условиях (например, при реперфузии). Таким образом, коллоидный лантан является удобным электронно-микроскопическим маркером таких дефектов плазматических мембран кардиомиоцитов, которые достаточны для возникновения неконтролируемого трансмембранного потока Са независимо от непосредственной причины его появления или количества внутриклеточных ультраструктурных изменений.

Так же как G. Rona и соавт. [8], которые использовали прижизненный трейсер пероксидазу, мы зарегистрировали с помощью коллоидного лантана грубое нарушение проницаемости внешней и внутренней мембран митохондрий и мембран саркоплазматического ретикулаума при необратимых изопротереноловых (кальциевых) повреждениях клетки. Длительная перманентная глубокая ишемия в течение 40 мин не приводила к появлению частиц коллоидного лантана в митохондриальном матриксе или в просвете саркоплазматического ретикулаума. Ранее это было показано и для более длительных сроков — даже после 3½—4 ч глубокой ишемии лантан локализуется вне митохондриального матрикса и просвета саркоплазматического ретикулаума [7, 18]. Однако ренкубация *in vitro* предварительно необратимо ишемизированного миокарда *in vivo* приводит к появлению La (OH)<sub>3</sub> в матриксе митохондрий и в просвете саркоплазматического ретикулаума. Этот эффект ассоциируется с аккумуляцией клетками Са, которая происходит в таких условиях [22]. По-видимому, фенестра после прямого контакта с ней избытков Са, так как даже очень

длительная ишемия без кальциевой нагрузки не вызывает эффекта появления коллоида в митохондриальном матриксе. Следовательно, проникновение лантана в митохондриальный матрикс можно считать морфологическим признаком кальциевой клеточной смерти.

Результаты данного исследования подтверждают наше предположение, что раннее проникновение лантана в мало измененные кардиомициты, расположенные на границе экспериментального инфаркта миокарда, следует объяснять не ишемическими повреждениями [7], а воздействием на клетки токсических доз β-адрепергических катехоламинов. Однако остается неясным, почему этому воздействию подвергается лишь часть клеток маргинальной зоны инфаркта, а изменения в других кардиомиоцитах протекают по ишемическому типу. Возможно, это зависит от локальных микроциркуляторных условий, что, однако, требует специальных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Veress B., Kerényi T., Hüttner I., Jellineck H. The phases of muscle necrosis.—*J. Path. Bact.*, 1966, 92, 511.
2. Kent S. P. Diffusion of plasma proteins into cells: a manifestation of cell injury in human myocardial ischemia.—*Am. J. Path.*, 1967, 50, 623.
3. Kent S. P. Diffusion of plasma proteins into cells: a manifestation of cell injury in rabbit skeletal muscle exposed to lecithinase C.—*Arch. Path.*, 1969, 88, 407.
4. Fahimi H. D., Cotran R. S. Permeability studies in heat induced injury of skeletal muscle using lanthanum as a fine structural tracer.—*Am. J. Path.*, 1971, 62, 143.
5. Hüttner I., Rona G., Theodosis D., More R. H. Ultrastructural studies on myocardial fibrin deposition in experimental hypertension.—In: *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, 1972, v. 1: Myocardiology, p. 376 /Eds. E. Bajusz, G. Rona. University Park Press, Baltimore.
6. Rona G., Hüttner L., More R. H. Fibrin as a natural tracer in cardiac muscle cell injury. In: *Present Status of thrombosis Its Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*, 1973 /Ed. R. Losito, p. 21.—Stuttgart—New York: F. K. Schattauer Verlag.
7. Hoffstein S., Gennaro D. E., Fox A. C. et al. Colloidal Lanthanum as a Marker for Impaired Plasma Membrane Permeability in Ischemic Dog Myocardium.—*Am. J. Path.*, 1975, 79, 207.
8. Rona G., Bontel M., Hüttner I. Membrane permeability alterations as manifestation of early cardiac muscle cell injury. In: *Recent Advance in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, v. 6: Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration, 1975, A. Fleckenstein, G. Rona (eds.), p. 439. Baltimore: University Park Press.
9. Hayat M. A. Positive Staining for Electron Microscopy.—Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1975.
10. Thoenes V. W., Langer K. H., Paul N. In vivo Markierung der Glykokalyx des Säugernephrons mit Meerrettichperoxydase.—*Cytobiol.*, 1972, 6, 487.
11. Böck V. P. Adsorption of horseradish peroxidase to negatively charged groups.—*Acta Histochem.*, 1972, 43, 8.
12. Böck V. P. Adsorption von Meerrettichperoxidase an rutheniumrotpositive Strukturen in markfreien Nerven.—*Acta Histochem.*, 1973, 46, 146.

13. *Revel J. P., Karnovsky M. J.* Hexagonal arra of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.—*J. cell. Biol.*, 1967, 33, С. 7.
14. *Jennings R. B., Sommers H. M., Smyth G. A.* et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.—*A. M. A. Arch. Path.*, 1960, 70, 68.
15. *Jennings R. B., Ganote C. E.* Structural changes in myocardium during acute ischemia.—*Circulat. Res.*, 1974, 35, 111, 156.
16. *Ganote C. E., Jennings R. B., Hill M. L., Grochowski E. C.* Experimental Myocardial Ischemic Injury. II. Effect of in vivo Ischemia on Dog Heart Slice Function in vitro.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1976, 8, 189.
17. *Grochowsky E. C., Ganote C. E., Hill M. L., Jennings R. B.* Experimental myocardial ischemic injury I. A comparison of Stadie-Riggs and free-hand slicing techniques on tissue ultrastructure, water and electrolytes during in vitro incubation.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1976, 8, 173.
18. *Hawkins H. K., Sharov V. G., Jennings R. B.* Cell membrane permeability defects demonstrated with colloidal lanthanum early in ischemic cell injury in dog heart.—In: Ninth international congress on electron microscopy, Toronto, 1978, v. 2, p. 306.
19. *Jennings R. B., Ganote C. E., Reimer K. A.* Ischemic Tissue Injury.—*Am. J. Path.*, 1975, 81, 179.
20. *Fleckenstein A., Janke J., Döring H. J., Leber O.* Key role of Ca in the production of noncoronarogenic myocardial necroses.—In: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, 1975, v. 6; Pathophysiology and Morphology of myocardial Cell Alterations, p. 21 /Eds. A. Fleckenstein, G. Rona. University Park Press, Baltimore.
21. *Jennings R. B., Shen A. C.* Calcium in experimental myocardial ischemia.—In: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism., 1972, v. 1; Myocardiology, p. 639. E. Bajusz, G. Rona (eds), University Park Press, Baltimore.
22. *Shen A. C., Jennings R. B.* Kinetics of Calcium Accumulation in Acute Myocardial Ischemic Injury.—*Am. J. Path.*, 1972, 67, 441.

УДК 616.12-089-06:616.127-008.9-02:616.127-005.4-021.6

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОЛНОЙ ИШЕМИИ ВО ВРЕМЯ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА СЕРДЦЕ

В. И. БУРАКОВСКИЙ, Д. В. САИРЫГИН, Л. С. КАШТЭЛЯН (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

Оперативные вмешательства на сердце часто осложняются нарушениями функции сердечной мышцы. Принято считать, что основной причиной повреждения миокарда при операциях на открытом сердце является полная ишемия остановленного сердца («кардиальный арест»), продолжительность которой варьирует от нескольких минут до 2 ч и более. Наряду с ишемией на миокард оказывают воздействие различные факторы паркоза, экстракорпорального кровообращения, стресс и операционная травма сердца.

Оценка характера и степени повреждения миокарда зависит от решения следующих вопросов: какие конкретные нарушения

в метаболизме и структурной организации миокардиальных клеток возникают при перечисленных воздействиях; в какие сроки операции или послеоперационного этапа они появляются; наконец, обратим ли процесс повреждения или же он завершается гибелью (некрозом) миокардиальной ткани.

Одним из наиболее ранних признаков повреждения сократительных клеток сердца является изменение их мембранной проницаемости [1, 2], причем при ишемии такие изменения в сарколемме рассматриваются как первый симптом необратимых повреждений [3]. Прямое выявление мембранных дефектов сердечных клеток в условиях клиники затруднительно, поэтому используется косвенный показатель нарушения мембранной проницаемости миоцитов — обнаружение в кровотоке повышенного уровня внутриклеточных миокардиальных ферментов. Именно этот феномен резкого возрастания активности сывороточных креатинфосфокиназы (КФК) и аспарагиновой аминотрансферазы (ГОТ) широко применяется в диагностике острого инфаркта миокарда.

Однако эти ферментные тесты малонформативны в оценке повреждений сердца при оперативных вмешательствах, так как уровень КФК и ГОТ возрастает в крови при любых операциях [4, 5] преимущественно за счет поступления в кровоток из скелетной мускулатуры, где они содержатся в еще больших количествах, чем в миокарде. Поэтому в данном исследовании мы оценивали повреждение миокарда путем определения артериовенозной разницы в сердце КФК, ГОТ и других ферментов, а также многоглобина и лактата. Кроме того, во время и после операций на сердце мы определяли в кровотоке содержание специфичного только для миокарда изофермента КФК МВ, выявление которого рассматривается как показатель необратимых (некротических) повреждений сердечной мышцы [6].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клинические данные

Исследования проведены у 30 больных, оперированных в отделении коронарной хирургии (первая группа), и у 30 больных, которым осуществлялось протезирование клапанов (у одного из них — аортальное протезирование с протезированием восходящего отдела аорты, имплантацией левой коронарной артерии и аортокоронарным шунтированием правой коронарной артерии), составивших вторую группу. Артериовенозная разница в сердце исследована у 24 больных первой группы и у 22 — второй. Первая группа больных включала две подгруппы: 10 оперированных по поводу резекции аневризмы левого желудочка и 20 больных с аортокоронарным шунтированием 1, 2 и 3 коронарных артерий. Операции проводились с применением искусственного кровообра-

щения и выключением коронарного кровотока (пережатием аорты), период которого варьировал от 5 мин до 2½ ч, и общей гипотермией (30°С). В первой группе больных защита миокарда во время пережатия аорты осуществлялась путем применения наружного охлаждения сердца (16—18°С), а во второй достигалась методом сочетания местного наружного охлаждения сердца (16—19°С) и введем в корень аорты или непосредственно в устье коронарных артерий охлажденного оксигенированного кардиоплегического раствора, содержащего ряд ингредиентов: ионы калия, магния, натрия, кальция, хлоридов, глюкозу, маннитол, повонан. Осмолярность кардиоплегического раствора — 300 мосм, рН 7,5. Раствор вводился дозированно: сразу после пережатия аорты и затем через каждые 30 мин ишемии, так что температура сердца поддерживалась в диапазоне 15—19°С. У всех оперированных осуществлялся постоянный ЭКГ-контроль.

Взятие крови для исследования артериовенозной разницы в сердце осуществляли на двух этапах операционного периода: непосредственно перед пережатием аорты и после снятия с нее зажима (пуск коронарного кровотока). Кровь брали из полости правого предсердия, области коронарного синуса при полностью пережатых полых венах, но свободной аорте на фоне начавшегося экстракорпорального кровообращения (8—10 мин) на первом этапе и продолжающегося искусственного кровообращения — на втором. Одновременно брали кровь из артериального русла.

Во время операции уровень КФК МВ определяли в венозной крови на двух указанных этапах, а также до операции, в момент канюляции периферических сосудов (начало анестезии) и в конце операции (закрытие грудной клетки). В послеоперационном периоде тестирование КФК МВ в венозной крови осуществляли через 2, 5, 8, 13, 18 и 30 ч после вмешательства.

В исследование были также включены как условно контрольная группа 12 человек с ишемической болезнью сердца (ИБС), у которых осуществлялась предсердная стимуляция сердца с одновременным исследованием КФК, КФК МВ и лактата в артериальной крови и крови из коронарного, венозного синуса сердца. Для взятия проб крови и выполнения теста предсердной стимуляции через левую подключичную вену вводили биполярный электрод-катетер и под флюороскопическим контролем устанавливали в просвете коронарного синуса. Положение электрода-катетера постоянно контролировали с помощью контрастной рентгеноскопии, ЭКГ и кривой давления в синусе. Стимуляцию проводили до частоты сердечных сокращений 160—170 в минуту или до возникновения загрудинных болей и изменений ЭКГ.

#### Биохимические материалы и методы

Определение КФК осуществляли активированным, кинетическим методом по модифицированной методике [7]. АСТ и аланиновую трансаминазу (ГПТ) определяли кинетическими методами

с активацией пиридоксаль-5-фосфатом [8]. Измерения активности ферментов проводили на анализаторах скорости реакций ЛКВ (Швеция) с компьютерным расчетом кинетических кривых HP-9815A (США) по стандартным программам фирмы. Каждая точка соответствовала среднему значению, полученному как минимум в результате трех повторных измерений. Одновременно осуществляли постоянный контроль качества путем ежедневного тестирования коммерческих контрольных сывороток «Boehringer» (ФРГ). Изоферменты КФК определяли электрофоретически на пленках ацетат целлюлозы Titun III (США) с последующей флюороденситометрией образцов и компьютерным расчетом денситограмм «Helena» (США). Для контроля осуществляли периодическое определение изоферментного спектра КФК в контрольных коммерческих сыворотках этой же фирмы. Уровень изоферментов ниже 3% в расчет не принимался. Кумулятивная активность КФК МВ, освобожденная в кровоток из сердца за весь период исследования, рассчитывалась по модифицированной формуле Shell и Sobel [9].

Лактат определяли ферментным стандартным методом, а миоглобин — с помощью радиоиммунологической методики.

Статистическая обработка данных артериовенозной разницы осуществлялась с помощью t-теста для спаренных величин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование КФК МВ в сыворотке крови на всех указанных выше этапах показало, что изофермент определялся хотя бы в 2—3 точках почти у всех больных (95%). Однако динамика изменения кривых активности КФК МВ в кровотоке у некоторых больных значительно варьировала, различаясь как по максимальным величинам подъема активности изофермента, так и по времени появления пиков КФК МВ и периоду циркуляции в кровотоке. Анализ кривых изменения активности КФК МВ позволил выделить три наиболее отличающихся по профилю типа кривых, приведенных на рис. 160. У большинства больных был выявлен 1-й тип кривых, характеризующийся небольшим повышением активности КФК МВ во время операции и быстрым снижением через несколько часов после нее (см. рис. 160, В). У другой, менее многочисленной, группы больных (табл. 45) повышение активности КФК МВ было зарегистрировано в более поздний период по сравнению с кривыми 1-го типа и достигало высоких максимальных значений (см. рис. 160, Б). Эти кривые были обозначены нами как кривые 2-го типа. И наконец, была выявлена небольшая группа из 8 человек (см. табл. 45), у которых характер изменения активности КФК МВ в динамике резко отличался от остальных значительным и более поздним подъемом активности изофермента (см. рис. 160, А). Более подробная характеристика различных типов кривых дана в табл. 45, из которой следует, что



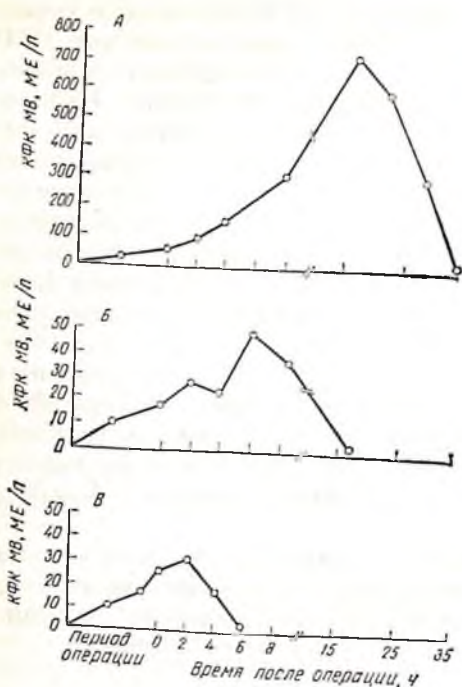


Рис. 160. Характер изменения активности КФК МВ у больных, оперированных на сердце, за весь период наблюдения (три класса кривых).

А — кривая 3-го типа; Б — кривая 2-го типа; В — кривая 1-го типа.

рой сердечной недостаточности, что не исключало у него наличия микродиффузных повреждений миокарда. Из 2 больных, оставшихся в живых из этой группы с кривыми 3-го типа, у одного имелись ЭКГ-признаки очагового поражения левого желудочка, а у другого сердечная деятельность восстановилась только после 6 дефибрилляций.

Результаты клинико-биохимических сопоставлений позволили нам прийти к заключению, что изменения активности КФК МВ

кривые 3-го типа резко отличаются по кумулятивному выбросу, максимальным значениям и срокам выявления повышенной активности от кривых 1-го и 2-го типов.

Чтобы выяснить значение выраженного выброса КФК из миокарда больных после операций на сердце, соответствующее кривым 3-го типа, было проведено клинико-биохимическое сопоставление. Оказалось, что из 8 человек с изменениями активности КФК МВ по 3-му типу 6 умерли при явлениях острой сердечной недостаточности. Посмертное исследование установило у 5 из них наличие инфаркта миокарда различной локализации. У одного из умерших инфаркта сердца обнаружено не было, однако время пережатия аорты (выключение коронарного кровотока) составило у него 148 мин, а послеоперационный период протекал с несомненными признаками ост-

ТАБЛИЦА 45

ВЫХОД ИЗОФЕРМЕНТОВ КФК В КРОВОТОК

Тип кривых	Время пика активности КФК МВ, ч	Пик активности КФК МВ, МЕ/л	Выход КФК МВ, МЕ мл <sup>-1</sup> /кг	% больных
1-й	2—4	40,3±3,2	I	60,7
2-й	6—8	94,3±10,0	10,02±1,7	25,3
3-й	15—18	444,6±121,9	102,3±23,3	14,0

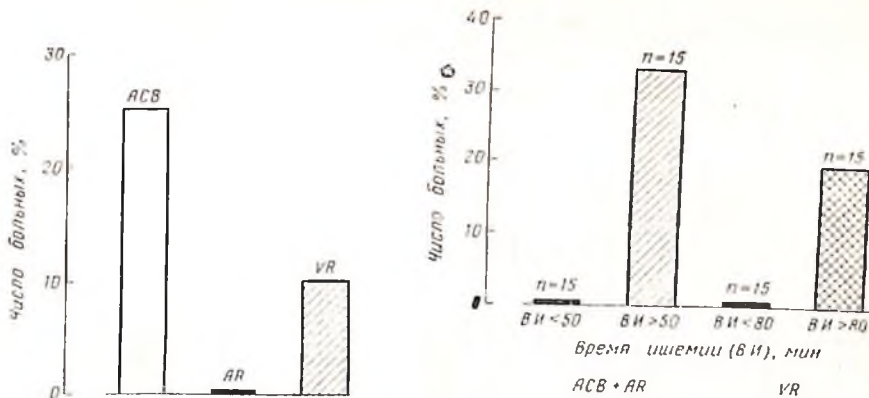


Рис. 161. Частота распределения больших (в процентах) с кривыми 3-го типа в зависимости от травматичности (характера) оперативного вмешательства.

ACSB — после аортокоронарного шунтирования; AR — после резекции аневризмы левого желудочка; VR — после протезирования клапанов.

Рис. 162. Частота выявления кривых 3-го типа (в процентах) среди больных 1-й и 2-й группы с различными сроками пережатия аорты (тотальной ишемии).

ACSB+AR — после аортокоронарного шунтирования и резекции аневризмы левого желудочка; VR — после операции протезирования клапанов сердца.

в динамике по 3-му типу с большой вероятностью свидетельствуют о возникновении в сердце зоны необратимых (некротических) повреждений. Этот вывод также подтверждали данные, что ни у одного больного с кривыми 1-го или 2-го типа как прижизненно, так и в случае смерти по причинам, не связанным с сердечной недостаточностью, инфаркт миокарда выявлен не был.

Было установлено, что выброс КФК МВ по 3-му типу не обусловлен операционной травмой (рис. 161). Так, кривые 3-го типа не были выявлены ни у одного больного, перенесшего такую травматичную для сердца операцию, как резекцию постинфарктной аневризмы левого желудочка, но чаще всего (25%) определялись у больных после аортокоронарного шунтирования, не сопровождавшегося прямой травматизацией сердечной мышцы. В меньшем числе случаев (10%) эти кривые 3-го типа определялись у больных с протезированием клапанов. С другой стороны, кривые 1-го типа, характеризующиеся минимальным выбросом КФК МВ из миокарда в кровоток (см. табл. 45), чаще всего обнаруживались в группе больных, перенесших резекцию аневризмы левого желудочка. В то же время кривые 3-го типа были выявлены у больных первой и второй группы со сроками пережатия аорты, превышавшими 50 и 80 мин соответственно (рис. 162), и не обнаружены ни у одного больного с периодом выключения коронарного кровообращения менее указанных. Полученная зависимость кривых 3-го типа от сроков пережатия аорты свидетельствует о том, что значительный выброс КФК МВ в кровоток

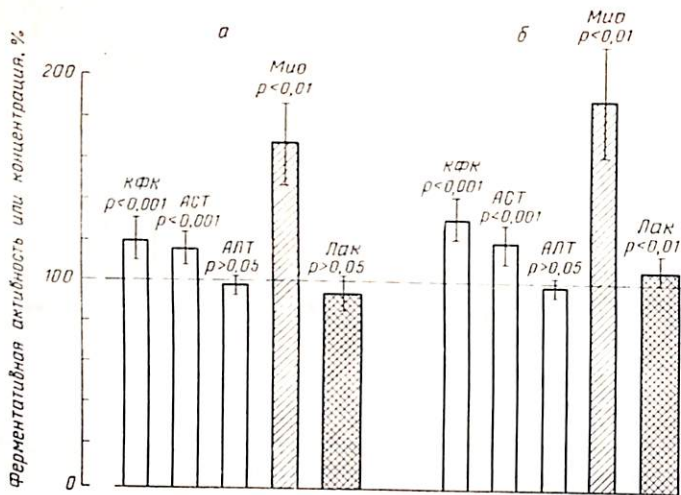


Рис. 163. Артериовенозная разница в сердце по ферментам, миоглобину и лактату на двух этапах операционного периода.  
 а — на этапе исследования до пережатия аорты и хирургического вмешательства на сердце; б — на этапе после снятия зажима с аорты и пуска коронарного кровотока. За 100% приняты активность ферментов и концентрации компонентов в артериальной крови. Мио — миоглобин, Лак — лактат.

обусловлен ишемическим повреждением миокарда необратимого характера.

Однако оставались непонятными причины обнаружения КФК МВ у остальных больных с динамикой изменения по 1-му и 2-му типам, соответствующим, как следует из табл. 45, небольшому повышению активности КФК МВ и кумулятивному освобождению его в кровоток. Так как пик активности изофермента у этих больных приходился на конец операции или ближайшие часы после нее, представляло интерес установить, существует ли артериовенозная разница в сердце по ферментам на различных этапах операционного процесса: до этапа пережатия аорты и сразу же после снятия зажима с аорты. Кроме ферментов на указанных этапах, в артериальной крови и крови, оттекающей от сердца (см. раздел «Материалы и методы»), исследовали содержание миоглобина и лактата.

Результаты исследований показали, что уже на этапе, предшествующем пережатию аорты и хирургическому вмешательству на сердце, происходит «утечка» внутриклеточных ферментов, сопровождающаяся продукцией лактата (рис. 163, а). Одновременно, как следует из этого рисунка, миокард теряет миоглобин, одинаково как в артериальной, так и в венозной крови, оттекающей от сердца. КФК МВ — миокардиально-специфичный изофермент, определялся на этом этапе в крови коронарного синуса почти у 50% больных. После периода тотальной ишемии (пере-

жатию аорты) отмечалось возрастание артериовенозного «градиента» в сердце по ферментам и миоглобину, причем оно уже сопровождалось выраженной продукцией лактата (рис. 163, б). Частота выявления КФК МВ в венозной крови сердца на этом этапе возросла и достигла 80%.

Нам не удалось обнаружить потери миокардом КФК, КФК МВ и ГОТ у больных условно контрольной группы, подвергнутой процедуре «пейеннга», как до, так и после навязывания ритма. В то же время до предсердной стимуляции отмечалось потребление лактата, а после — его продукция.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для установления необратимого, некротического повреждения сердечной мышцы (инфаркт миокарда) в клинике широко используется тестирование в крови повышенного уровня содержащихся в миокарде ферментов (КФК, КФК МВ, АСТ и др.). Из них только КФК МВ практически абсолютно специфичен для миокардиальной ткани, поэтому выявление в крови этого изофермента рассматривается как достоверный признак необратимых повреждений миокарда [6] и инфаркта миокарда у больных [10, 11]. С этой точки зрения вызывает удивление обнаруженное рядом исследователей [9, 12—15] и нами почти 100% появление КФК МВ в кровотоке при операциях на сердце с применением искусственного кровообращения. Этот факт оставался трудно объяснимым, так как требовал допущения наличия инфарктных повреждений миокарда почти у всех без исключения оперированных на сердце.

Применив метод серийных исследований КФК МВ во время и после операций на сердце, мы обнаружили значительные различия в характере изменения активности КФК МВ, максимальных значениях его активности и кумулятивном освобождении в кровотоке у некоторых больных (см. рис. 160, табл. 45), причем оказалось, что только у лиц с подтвержденным посмертно или прижизненно инфарктом миокарда отмечаются высокая активность КФК МВ и значительный выброс его в кровоток, соответствующий кривым 3-го типа. Корреляция между длительностью пережатия аорты и кривыми 3-го типа и одновременное отсутствие совпадений с травматичностью операции для сердца (см. рис. 161, 162) позволяют нам заключить, что кривые 3-го типа отражают некроз миокардиальной ткани, связанный с ишемическим (гипоксическим) повреждением сердечной мышцы.

Однако особый интерес, с нашей точки зрения, представляли результаты исследований артериовенозной разницы в сердце на различных этапах операции по ферментам, миоглобину и лактату (см. рис. 163). Так, мы обнаружили, что еще до этапа пережатия аорты и хирургического вмешательства на сердце наблюдается потеря миокардом КФК, АСТ и миоглобина, а также КФК

МВ (см. рис. 163, а). Важно подчеркнуть, что эта «утечка» внутриклеточных компонентов из сердца, свидетельствующая о нарушении проницаемости сарколеммальных мембран, не сопровождается продукцией лактата, т. е., возможно, протекает без значительных и сколько-нибудь серьезных нарушений метаболизма в сердечных клетках. На втором этапе исследования (после спятия зажима с аорты) этот выброс миокардом и миоглобина возрастал и уже сопровождался значительной продукцией лактата, т. е. нарушения мембранной проницаемости усиливались и сочетались с метаболическими изменениями в миокардиальных клетках. Как известно, ишемическое повреждение сердечных клеток, достигая стадии необратимости, сопровождается резкими изменениями в структурной организации сарколеммальных мембран [3], что и приводит к значительной потере внутриклеточных ферментов и других компонентов из миокарда в кровоток. Такой выброс КФК МВ, свидетельствующий о гибели клеток миокарда, и был нами выявлен в виде кривых 3-го типа. Однако нарушение проницаемости сарколеммальных мембран может возникать и при других воздействиях на сердечные клетки, например под влиянием катехоламинов [2, 17], причем без алтерации клеточных органелл [17]. Вероятно, именно таким воздействием и объясняется обнаружение КФК МВ в крови при ятрогенной травме сердца, без подтвержденного инфаркта миокарда [16]. В связи с этим не исключено, что причиной обнаруженной нами потери ферментов и миоглобина миокардом еще до этапа пережатия аорты является не гипоксическое воздействие вследствие нарушений микроциркуляции и др., а влияние на мембранную проницаемость катехоламинов (норадреналин) или ряда других гормонов, системное или локальное освобождение которых может быть индуцировано манипуляциями на полых венах и операционным стрессом. Последующее воздействие тотальной ишемии (пережатие аорты) может усугубить это повреждение и привести к развитию некрозов миокарда. Вероятно, последовательность событий при таком «ишемическом» повреждении сердца отличается от ишемии, начинаясь с дефектов сарколеммальных мембран, что приводит к потере важных для клетки внутриклеточных компонентов и как следствие этого — к метаболическим сдвигам. При ишемическом повреждении отмечается обратное течение событий: нарушения в метаболизме вызывают повреждения в структурной организации мембран.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, вероятно, оба обсуждаемых типа повреждения сердечных клеток в отдельности или в сочетании имеются при оперативных вмешательствах на открытом сердце с применением экстракорпорального кровообращения. Однако требуется проведение дальнейших клинических и экспериментальных исследований для окончательного выяснения механизмов повреждения миокарда при опера-

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Института сердечно-сосудистой хирургии А. И. Малащенко, М. Е. Полоцкой, Л. А. Мигалиной, А. И. Беличкову за техническую помощь в проведении ряда исследований и анализе клинического материала.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hoffstein S., Gennaro D. E., Fox A. C. et al.* Colloidal Lanthanum as a Marker for Impaired Plasma Membrane Permeability In Ischemic Dog Myocardium.—*Am. J. Path.*, 1975, 79, 207.
2. *Rona G., Boutet M., Huttner I.* Membrane permeability alterations as manifestation of early cardiac muscle cell injury. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, v. 6: Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration, 1975, A. Fleckenstein, G. Rona (eds.), p. 439, Baltimore: University Park Press.
3. *Ganote C. E., Jennings R. B., Hill M. L. et al.* Experimental myocardial ischemic injury. II. Effect of in vivo ischemia on dog heart slice function in vitro.—*J. Mol. cell. Cardiol.*, 1976, 8, 189—204.
4. *Dixon S. H., Fuchs J. C. A., Ebert P. A.* Changes in Serum CPK Activity Following Thoracic, Cardial and Abdominal Operations.—*Arch. Surg.*, 1971, 103, 66.
5. *Phornphutkul K. et al.* Causes of increased plasma CPK activity after surgery.—*Clin. Chem.*, 1974, 20, 3, 340.
6. *Ahmed S. A., Williamson J. R., Roberts R. et al.* The association of increased plasma MB CPK activity and irreversible ischemic myocardial injury in the dog.—*Circulation*, 1976, 54, 2, 187.
7. *Szasz G., Gruber W., Bernt E.* Creatine Kinase in Serum and Determination of Optimum Reaction Conditions.—*Clin. Chem.*, 1976, 22, 5, 650—656.
8. *Bergmeyer H. U., Bowles G. N., Horder M. et al.* Provisional Recommendations on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes.—*Clin. Chem.*, 1977, 23, 5, 877—899.
9. *Delva E., Maille J.-G., Solymoss B. C. et al.* Evaluation of Myocardial Damage During Coronary Artery Crafting with Serial Determinations of Serum CPK MB Isoenzyme.—*J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1978, 75, 467—472.
10. *Roberts R., Sobel B. E.* Creatine Kinase Isoenzymes in the Assessment of Heart Disease.—*Am. Heart J.*, 1978, 95, 521.
11. *Klein H., Shell W. E., Sobel B. E.* Serum CPK Isoenzymes after Intramuncular Infection, Surgery and Myocardial Infarction. Experimental and Clinical Studies.—*Cardiovasc. Res.*, 1973, 7, 412—418.
12. *Klein H., Coleman R. E., Weldon C. S. et al.* Concordance of Electrocardiographic Criteria of Myocardial Injury after Cardial Surgery.—*J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1976, 71, 6, 934—937.
13. *Gray R. J., Shell W. E., Conclin C. et al.* Quantification of Myocardial Injury during Coronary Artery Bypass Graft.—*Circulation*, 1978, 58, 3, suppl. 1, 38—42.
14. *Adappa M. C., Jacobson L. B., Hitzer R. et al.* Cold Hypercalemic Cardiac Arrest versus Intermittent Aortic Cross-clamping and Topical Hypothermia for Coronary Bypass Surgery.—*J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 1978, 75, 2, 171—178.
15. *Weisel R. D., Irving H. et al.* Cardiac Metabolism and Performance Following Cold Potassium Cardioplegia.—*Circulation*, 1978, 58, 3, suppl. 1, 217—226.
16. *Tonkin A., Lester R., Guthrow E. et al.* Persistence of MB isoenzyme of creatine phosphokinase in the Serum Minor Introgenic Cardiac Trauma.—*Circulation*, 1975, 51, 627.
17. *Waldenstrom A. P., Hjalmanson A. C., Thornell L.* A possible role of Noradrenaline in the Development of Myocardial Infarction.—*Am. Heart J.*, 1978, 95, 1, 43—51.

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИПОСОМ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В. П. ТОРЧИЛИН, В. Р. БЕРДИЧЕВСКИЙ (СССР),  
БАН АН КО (BAN AN KHAW) (США),  
В. М. ЗЕМСКОВ (СССР),  
Э. ХАБЕР (E. HABER) (США),  
В. Н. СМИРНОВ, Е. И. ЧАЗОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы искусственные фосфолипидные пузырьки — липосомы, чаще всего получаемые механическим воздействием на дисперсии фосфолипидов в водных растворах [1], стали рассматривать как перспективные средства для транспортировки лекарственных соединений в организме [2, 3]. Включенное внутрь липосом лекарственное соединение не контактирует с компонентами крови, не вызывает побочных явлений и не претерпевает быстрой биодеградация [4]. Более того, липосомы как носители лекарств не только отличаются высокой степенью биосовместимости и составляющие их фосфолипиды полностью утилизируются в организме, но и представляют уникальную возможность доставки лекарств внутрь клеток, с которыми липосомы могут взаимодействовать путем слияния или эндоцитоза [2]. К сожалению, как показали многочисленные эксперименты, через весьма непродолжительное время после введения липосомы быстро выводятся из кровотока вследствие захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы, в первую очередь печени, практически независимо от способа введения, фосфолипидного состава самих липосом, их заряда или размера [5—7]. Для обеспечения большой эффективности транспорта лекарств в липосомах, в принципе могут быть использованы два подхода. Во-первых, можно каким-либо способом так модифицировать липосомы, чтобы они перестали поглощаться печенью. Например, предпринимаются попытки (приводящие, правда, пока к неоднозначным результатам) использовать липосомы, сформированные из не подверженных действию расщепляющих фосфолипиды ферментов аналогов фосфолипидов [8, 9]. Перспективным может явиться и покрытие поверхности обычных липосом какими-либо не поглощаемыми печенью белками или белковыми агрегатами. Во-вторых, эффективность транспорта может быть повышена путем придания несущим лекарство липосомам специфического сродства к органу-мишени. Такое сродство может быть достигнуто благодаря использованию специфических макромолекулярных лигандов, связанных с паружной поверхностью липосом. Наиболее часто в

качестве таких специфических лигандов рассматривают иммуноглобулины против различных химических соединений — специфических компонентов органа-мишени. Сама по себе идея использования антител для направленного транспорта лекарств уже в течение нескольких лет обсуждается в научной литературе [10, 11]. При этом предлагается, например, конструирование синтетических систем, включающих биосовместимый полимерный носитель, к которому ковалентно присоединены молекулы лекарства и молекула специфического лиганда [11]. Не исключено, что «коэффициент полезного действия» специфических макромолекулярных лигандов будет максимален при их использовании для связывания с липосомами, в каждую из которых может быть включено значительное количество лекарственного соединения. Уже описаны попытки повысить специфичность взаимодействия липосом с различными клетками путем покрытия наружной поверхности липосомальных мембран специфическими или неспецифическими иммуноглобулинами [12, 13]. Однако, как специально отмечено в одном из последних обзоров, посвященных использованию липосом для транспорта белков [14], проблема направленного транспорта остается наименее разработанной.

На наш взгляд, незначительные успехи в этом направлении можно объяснить как недостаточной разработанностью способов связывания специфических лигандов с поверхностью липосом, что нередко приводит к заметной потере активности лиганда, так и малым количеством экспериментов с индивидуальными системами антитело — антиген, а не с неспецифическими иммуноглобулинами.

В настоящей работе мы попытались найти новый способ ковалентного связывания белков с поверхностью липосом и проверить его пригодность на примере связывания антител против мюзиона из сердечной мышцы и против коллагена типа I.

### КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С ПОВЕРХНОСТЬЮ ЛИПОСОМ ЧЕРЕЗ «ПОЖКУ»

Из общих соображений очевидно, что для успешного функционирования связанных с липосомами белков с поверхностью липосом должно быть связано достаточное количество белка. Его связь с мембраной должна быть прочной, специфические связывающие свойства белка должны остаться неизменными и не должна нарушаться целостность липосомы, уже содержащей включенное лекарственное или модельное соединение.

Традиционные методы связывания белков в липосомы встраиванием в процессе их формирования или адсорбцией на поверхности уже сформированных липосом обычно не полностью удовлетворяют перечисленным требованиям. Очевидно, достичь прочного связывания белка при адсорбции можно только при наличии



гидрофобных взаимодействий между липосомальной мембраной и неполярными участками белковой глобулы, что реализуется лишь в некоторых случаях [15, 16]. Белок же, встроенный в мембрану, может заметно понизить свою специфическую связывающую способность из-за стерических затруднений, вызванных близостью мембраны, или из-за частичной или полной денатурации под действием неполярных компонентов мембраны.

С другой стороны, из теории и практики аффинной хроматографии и иммобилизации ферментов хорошо известно, что подобных нежелательных явлений можно избежать, если предназначенную для связывания белка реакционно-способную группу отодвинуть от поверхности матрицы благодаря ее связыванию через инертную углеводородную ножку [17, 18]. Именно такой принцип связывания белков мы и использовали в наших экспериментах [19, 20]. С этой целью в липидную смесь, предназначенную для формирования липосом, был введен фосфатидилэтанолами, имеющий реакционно-способную группу (детали эксперимента описаны нами в [20]). Сформированные липосомы были активированы путем обработки их поверхности диальдегидом или динимидатом, что позволило ввести в них реакционно-способные по отношению к белку группы, удаленные от поверхности липосомы на длину цепи использованного бифункционального реагента. Одновременно было показано, что при такой обработке предварительно включенный внутрь липосомы радиоактивный маркер не выходит наружу, т. е. липосомы остаются интактными. С полученными активированными липосомами был связан модельный белок — фермент  $\alpha$ -химотрипсин и было определено как количество связанного фермента, так и сохранение им специфической активности и способность ингибироваться высокомолекулярным белковым ингибитором (взаимодействие фермент — высокомолекулярный ингибитор можно в известной мере рассматривать как

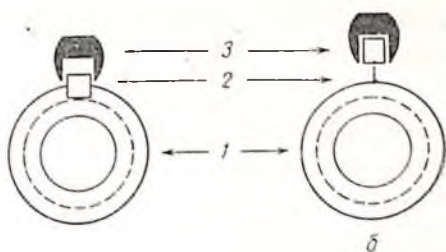
ТАБЛИЦА 46

СВОЙСТВА  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА, СВЯЗАННОГО С ЛИПОСОМАМИ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Метод связывания	Количество связанного фермента, моль/моль липида	Процент сохранения внутреннего маркера в липосомах после процесса ассоциации фермента	Отношение кажущихся констант ингибирования иммобилизованного и нативного $\alpha$ -химотрипсина панкреатическим ингибитором трипсина
Адсорбция	$2,0 \cdot 10^{-5}$	70	1
Встраивание	$4,7 \cdot 10^{-5}$	80	5
Ковалентное связывание через:	4,9 · 10 <sup>-5</sup>	100	1
	7,1 · 10 <sup>-5</sup>	75	1
динимидат			
диальдегид			

Условия эксперимента см. [20].

Рис. 164. Схематическое изображение липосом (1) с иммобилизованным на их поверхности ферментом или антителом (2). В случае встроения белка (а) специфическое связывание с высокомолекулярным антигеном или субстратом (3) невозможно. Ковалентно связанный через «ножку» белок (б) обеспечивает связывающую способность полностью.



модель взаимодействия антиген — антитело). Полученные результаты сравнивались с теми же параметрами фермента, связанного с поверхностью липосом традиционными методами. Результаты эксперимента приведены в табл. 46.

Полученные данные свидетельствуют, что заметные количества белка могут быть связаны с липосомами только встраиванием или ковалентным присоединением. При этом ковалентное присоединение через «ножку» обладает рядом неоспоримых преимуществ: 1) если при встраивании фермента часть его попадает во внутреннее пространство липосом, что показано разрушением липосом добавленным тригоном X-100 с последующим определением степени увеличения ферментативной активности в реакционном растворе, то при ковалентном присоединении этого вообще не происходит; 2) если при встраивании часть молекул белка (до 50%) теряет способность взаимодействовать с белковым ингибитором из-за стерических затруднений, создаваемых близостью мембраны, то при ковалентном присоединении через «ножку» более 80% молекул связанного фермента сохраняют неизменное сродство к белковому ингибитору (рис. 164, 165).

Таким образом, ковалентное связывание белков с поверхностью липосом через «ножку», после предварительного введения в состав липосомальной мембраны реакционно-способных липидов и обработки полученных липосом бифункциональными реагентами, до известной степени позволяет решить поставленную задачу — прочно связать с поверхностью липосомальной мембраны достаточное количество макромолекулярного лиганда с неизменными связывающими свойствами.



Рис. 165. Ингибирование панкреатическим ингибитором трипсина пассивного и иммобилизованного на поверхности липосом  $\alpha$ -химотрипсина.

## СОХРАНЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СВЯЗАННЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Следующим этапом нашей работы было изучение возможности создания реальных транспортных систем, пригодных для использования в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В ряде работ в последние годы было показано, что очищенные антитела против миозина из сердечной мышцы или их  $(Fab')_2$ -фрагменты эффективно взаимодействуют с сердечным миозином в условиях *in vitro* и *in vivo* и могут быть успешно использованы для визуализации некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда после предварительного мечения радиоактивными изотопами [21—23]. Естественно было предположить, что те же антитела могут быть использованы для направленного транспорта включенных в липосомы лекарств непосредственно в пораженную зону при инфаркте миокарда.

Для экспериментального изучения процессов связывания антител с липосомами последние были получены по методу [20], и по тому же методу их поверхность была активирована глутаровым альдегидом. Избыток диальдегида удаляли диализом, а к активированным липосомам добавляли меченные  $^{125}I$  антимиозиновые антитела, немеченные антитела или немеченый неспецифический кроличий IgG. Смесь инкубировали ночь для протекания реакции между аминокислотными остатками белка и альдегидными группами активированных липосом. Невязанный белок отделяли гель-хроматографией на колонке с сефарозой-4В, а количество связанного белка определяли или по ассоциированной с фракцией липосом радиоактивности, или по оптической плотности белка при 280 нм (в этом случае после предварительного разрушения липосом добавлением тритона X-100). Данные, приведенные на рис. 166, показывают, что при использованных концентрациях белка в реакционной смеси (порядка  $10^{-4}$  М) с липосомами может быть связано от 40 до 60% добавленных антител или неспецифического иммуноглобулина. При этом на каждую тысячу молекул липида может быть связано от 0,1 до 0,2 молекулы белка в зависимости от того, фракция каких липосом — моноламеллярных или мультиламеллярных — рассматривается (в среднем, по данным [20], в условиях эксперимента мы имеем

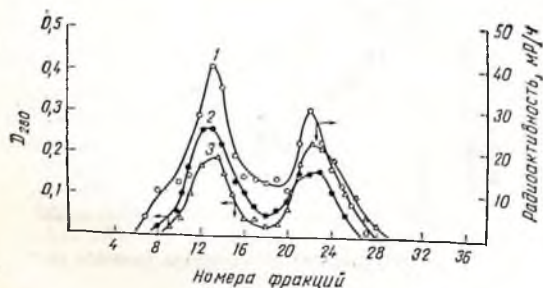


Рис. 166. Гель-хроматография на колонке с сефарозой-4В связанных с липосомами антимиозиновых антител.

1 — антитела, меченные  $^{125}I$ ;  
2 —  $D_{280}$  для немеченых антител;  
3 —  $D_{280}$  для неспецифического IgG.

дело с липосомами диаметра порядка 80 нм, в состав которых по расчетным данным входит несколько тысяч молекул липидов)..

Результаты изучения специфической активности связанных с липосомами антител в сравнении с активностью неспецифического иммуноглобулина в процессе их взаимодействия с антигеном — меченым  $^{125}\text{I}$  миозином из сердечной мышцы собаки, полученным по методу [24], в реакции иммунопреципитации приведены в табл. 47 [25].

ТАБЛИЦА 47

СВОЙСТВА СВЯЗАННЫХ С ЛИПОСОМАМИ АНТИМИОЗИНОВЫХ АНТИТЕЛ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА В РЕАКЦИИ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ С МЕЧЕНЫМ  $^{125}\text{I}$  МИОЗИНОМ

Препарат	Среднее число молекул — белка на тысячу молекул фосфолипидов	Процент осаждения в расчете на одно и то же количество белка (осаждение нативных антител принято за 100 %)
Нативные антитела	—	100
Чистый кроличий IgG	—	8,5
Белки, связанные с поверхностью липосом через глутаровый альдегид:		
антитела на мультиламеллярных липосомах	0,08	35
антитела на моноламеллярных липосомах	0,2	72
Неспецифический иммуноглобулин на моноламеллярных липосомах	0,2	8

Условия эксперимента см. [25].

Эти результаты показывают, что в стандартных условиях проведения реакции иммунопреципитации антитела, ковалентно связанные с липосомами через «ножку», дают высокую степень осаждения в комплексе с антигеном, приближающуюся к степени осаждения нативных антител и далеко превосходящую степень осаждения контрольного неспецифического иммуноглобулина. Наблюдаемые результаты не могут быть связаны с отщеплением иммобилизованных антител от поверхности липосом, так как рехроматография системы после 3 дней хранения показала, что более 90% белка остается связанным с липосомами. Более того, иммобилизованные на липосомах описанным способом антитела обладают способностью взаимодействовать не только с растворенным антигеном, но и с антигеном в виде иммуносорбента. Так, хроматография препаратов липосом, содержащих меченый  $^3\text{H}$  холестерин и иммобилизованное на поверхности немеченое антитело, на колонке с миозин-сефарозой-4В, результаты которой приведены на рис. 167, показала, что значительная часть  $^3\text{H}$ -радиоактивности удерживается на колонке и смывается только после

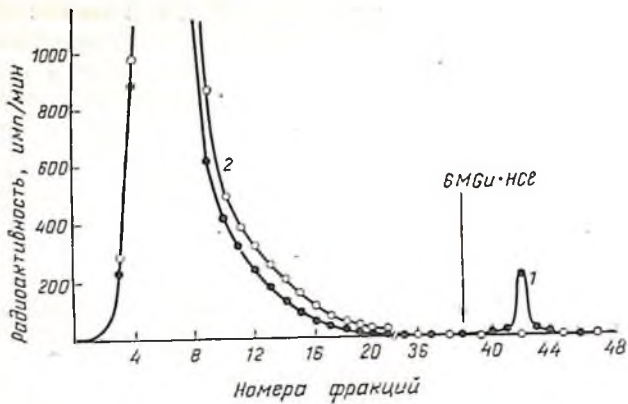


Рис. 167. Гель-хроматография на колонке с миозин-сефарозой-4В антител к миозину и неспецифического кроличьего Ig G, связанных с мечеными <sup>3</sup>H-холестеринном липосомами.

элюирования 6 М гуанидинхлоридом, разрушающим комплекс антиген — антитело.

Полученные результаты позволяют надеяться на применимость изученной системы для осуществления направленного транспорта лекарств в зону некроза при инфаркте миокарда, поскольку присутствие липосомы не влияет на процесс опознавания антигена связанным антителом и на процесс специфического связывания. Предварительные эксперименты, проведенные на собаках с инфарктом, вызванным перевязкой коронарной артерии, показали, что если использовать для интракоронарного введения липосомы с включенной внутрь радиоактивной меткой (ковалентно связанные с поверхностью липосом немеченые антимиозиновые антитела), то удастся наблюдать концентрирование радиоактивности в зоне некроза. Это концентрирование не может быть вызвано неспецифическим связыванием, поскольку замена антитела неспецифическим иммуноглобулином эффекта концентрирования не дает. Иными словами, и в реальной системе антитела способны транспортировать «груженные» липосомы в орган-мишень, что указывает на возможность создания комплексной системы, пригодной одновременно и для диагностической визуализации очага поражения, и для транспортировки в этот очаг терапевтических агентов.

Изученная система, разумеется, не единственная, представляющая интерес для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Так, например, хорошо известно, что начальной стадией многих патологических процессов в сосудах, приводящих к образованию тромбов или атером, является нарушение целостности эндотелиального слоя, в результате чего обнажается коллагеновая подложка, на которую начинают «палить» тромбоциты [26]. Это указывает на возможный путь блокирования патологии в начальной

стадии, если на место нарушения эндотелия каким-либо способом доставить агенты, которые или предотвращают налипание тромбоцитов, или ускоряют заращание поврежденного участка новым эндотелием, или и то и другое вместе. Пригодная для этой цели система должна или во всяком случае может представлять собой содержащее соответствующий препарат липосомы, к поверхности которых присоединены антиколлагеновые антитела.

В начальной стадии разработки такой системы была проведена иммунизация кроликов коллагеном типа I, после чего выделенная сыворотка иммунизированных животных была подвергнута предварительной очистке на полнакриламидном сорбенте с коллагеном быка типа I по методу [27]. Выделенная фракция иммуноглобулинов, обладавшая повышенной степенью осаждения в реакции иммунопреципитации с  $^{125}\text{I}$  меченым коллагеном, была по описанному выше методу иммобилизована на поверхности липосом, в состав которых входил  $^{14}\text{C}$ -холестерилолеат. Для проверки способности полученных конъюгатов специфически связываться с коллагеном по методу [28], были получены полистирольные микроемкости, внутренняя поверхность которых покрыта слоем коллагена. Далее эксперимент проводили с тремя сериями по 5 микроемкостей в каждой: в первую серию было добавлено по 100 мкл суспензии контрольных липосом, обработанных глутаровым альдегидом, во вторую — по 100 мкл активированных липосом с иммобилизованным неспецифическим иммуноглобулином, в третью — по 100 мкл липосом с иммобилизованными иммуноглобулинами, обладающими повышенным сродством к коллагену. После 3-часовой инкубации все емкости многократно промывали до прекращения обнаружения радиоактивности в промывных водах, что означает сход с коллагеновой подложки основной массы неспецифически сорбированных меченых липосом. Затем емкости были промыты 6 М гуанидинхлоридом, разрушающим взаимодействие антиген — антитело, и 1% раствором тритона X-100, переводящим в раствор фосфолипиды и другие компоненты липосомальных мембран. Радиоактивность промывных жидкостей была измерена в сцинтилляционном счетчике.

ТАБЛИЦА 48

СВЯЗЫВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕЧЕНЫХ ЛИПОСОМ С КОЛЛАГЕНОВОЙ ПОДЛОЖКОЙ

Препарат	Относительная эффективность связывания
Липосомы без белка	1,00
Липосомы с иммобилизованным на их поверхности неспецифическим IgG	1,05
Липосомы с иммобилизованным иммуноглобулином, обладающим повышенным сродством к коллагену	2,80

Данные эксперимента, приведенные в табл. 48, показывают, что заметно повышенные количества радиоактивности удается смыть с коллагена из емкостей, в которых находились липосомы со специфическими иммуноглобулинами. Иными словами, как и в случае антимозиновых антител, при иммобилизации на поверхности липосом через «ножку» удается сохранить активность иммуноглобулинов, обладающих повышенным сродством к коллагену. Разумеется, все сделанное — лишь первый шаг на пути создания ранее обсуждавшихся препаратов, предназначенных для специфического связывания с обнажившимся коллагеном сосудов.

Резюмируя все изложенное, можно полагать, что несущие на своей поверхности специфические антитела липосомы представляют собой перспективное средство для направленного транспорта лекарственных соединений в терапии сердечно-сосудистых и, по-видимому, многих других заболеваний. Исследования в этом направлении нуждаются в дальнейшем развитии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bangham A. D., Standish M. M., Weissmann G.* The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations.— *J. mol. Biol.*, 1965, 13, 253.
2. *Gregoriadis G.* Medical applications of liposome entrapped enzymes.—In: *Immobilized Enzymes*. Ed. K. Mosbach. *Methods in Enzymology*, New York—San Francisco—London: Acad. Press, 1976, v. 44, p. 698—709.
3. *Gregoriadis G.* Liposomes in the therapy of lysosomal storage diseases.— *Nature*, 1978, 275, 695.
4. *Fendler J. H., Romero A.* Liposomes as drug carriers.— *Life Sci.*, 1977, 20, 1109.
5. *Gregoriadis G., Ryman B. E.* Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage disease.— *Eur. J. Biochem.*, 1972, 24, 485.
6. *McDougall I. R., Dunnick I. K., McNamee M. G.* Distribution and fate of synthetic lipid vesicles in the mouse. A combined radionuclide and spin label study.— *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1974, 71, 3487.
7. *Juliano R. L., Stamp D.* The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, 63, 651.
8. *Deshmukh D. S., Bear W. D., Wisniewsky H. M., Brockerhoff H.* Longliving liposomes as potential drug carriers.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1978, 82, 328.
9. *Горчилин В. П., Бердичевский В. Р., Гольдмахер В. С.* и др. Динамика выведения из кровотока липосом из пепидролизуемого диэфирного аналога фосфатидилхолина при внутривенном введении мышам. — *Бюлл. экпер. биол.* 1979, в печати.
10. *Gregoriadis G.* Targeting of drugs.— *Nature*, 1977, 265, 407.
11. *Goldberg E. P.* Polymeric affinity drugs for cardiovascular, cancer and urolithiasis therapy.—In: *Polymeric Drugs*. New York—San Francisco—London: Acad. Press, 1978, p. 239—262.
12. *Gregoriadis G., Neerunjun E. D.* Homing of liposomes to target cells.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1975, 65, 537.
13. *Weissmann G., Bloombarten D., Kaplan R., Cosen C., Hoffstein S., Collins T., Gottlieb A., Nagle D.* A general method for the introduction of enzymes, by means of immunoglobulin-coated liposomes, into lysosomes of deficient cells.— *Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 1975, 72, 88.

14. Finkelstein M., Weissmann G. The introduction of enzymes into cells by means of liposomes.—*J. Lipid. Res.*, 1978, 19, 289.
15. Tyrrell D. A., Heath T. D., Colley C. M., Ryman B. E. New aspects of liposomes.—*Biochim. biophys. Acta.* 1976, 457, 259.
16. Solomon B., Miller I. R. Interaction of glucose oxidase with phospholipid vesicles.—*Biochim. biophys. Acta.* 1976, 455, 332.
17. Иммобилизованные ферменты/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинека. — М.: Изд-во МГУ, 1976, т. 2, с. 76—79.
18. *Immobilized Enzymes* (K. Mosbach, ed.). *Methods in Enzymology*. V. 44.— New York—San Francisco—London: Acad. Press, 1976.
19. Торчилин В. П., Гольдмахер В. С., Смирнов В. П. Связывание белков с липосомами. — *Биоорг. хим.*, 1978, 4, 1560.
20. Torchilin V. P., Goldmacher V. S., Smirnov V. N. Comparative studies on covalent and noncovalent immobilization of protein molecules on the surface of liposome.—*Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1978, 85, 983.
21. Van-An Khaw, Bitler G. A., Haber E. Experimental myocardial infarct imaging following intravenous administration of iodine-131 labeled antibody (Fab)<sub>2</sub> fragments specific for cardiac myosin.—*Circulation*, 1978, 57, 743.
22. Beller G. A., Van-An Khaw, Haber E., Smith T. W. Localization of radio-labeled cardiac myosin-specific antibody in myocardial infarcts.—*Circulation*, 1977, 55, 74.
23. Хабер Э., Ван-Ан Ко, Беллер Дж., Гольд Г. Использование антител, специфичных к сердечному миозину, для определения локализации инфаркта миокарда. — В кн.: *Метаболизм миокарда*/Под ред. Е. П. Чазова, Х. Е. Моргана. — М.: Медицина, 1979, с. 345—361.
24. Marchalonis J. J. An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.—*Biochem. J.*, 1969, 113, 299.
25. Торчилин В. П., Ван-Ан Ко, Бердичевский В. Р., Локе Э. Р., Смирнова В. П., Хабер Э., Чазов Е. П. Сохранение специфической связывающей способности антителами, ковалентно связанными с поверхностью липосом.— *Докл. АН СССР*. 1979.
26. Ross R., Glomset J. A. The pathogenesis of atherosclerosis.—*New Engl. J. Med.*, 1976, 295, 369.
27. Carrel S., Barandun S. Protein-containing polyacrylamide gels: their use as immunoadsorbents of high capacity.—*Immunochemistry*, 1971, 8, 39.
28. Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Flowline Publ., Cuernsey, Europe, 1977.

УДК 612.172.014.46:615.217.22+615.217.24

## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ $\beta$ -БЛОКАТОРОВ И $\beta$ -СТИМУЛЯТОРОВ НА ФУНКЦИЮ МИОКАРДА

Б. И. ТРАЧЕНКО, Р. А. КАЦЕНОВИЧ, С. З. КОСТКО, Х. А. ХАШИМОВ,  
А. Ш. КАСЫМХОДЖАЕВ, З. З. ЮСУФОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

С появлением фармакологических средств, оказывающих блокирующее или стимулирующее действие на  $\beta$ -адренорецепторы, возникло принципиально новое направление в лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний. Особенно эффективным оказалось использование этих препаратов при ишемической болезни сердца [1—8]. Вместе с тем остаются не вполне ясны характер и меха-



низм влияния данных веществ на кровоснабжение сердца во взаимосвязи с изменением его функциональной активности и состоянием метаболизма. Решение задач, вытекающих из всего изложенного, возможно, позволит расшифровать механизм благоприятного терапевтического действия этих препаратов, учитывая его зависимость от состояния кровообращения и интенсивности метаболизма в миокарде. Актуальность подобных исследований в определенной мере обусловлена и высокой лечебной эффективностью препаратов с противоположным характером действия при одном и том же заболевании. В известной нам литературе отсутствуют данные о характере изменений в венозной части коронарного русла при блокаде или стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов. Настоящее исследование направлено на выяснение возникших вопросов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение влияния препаратов на взаимоотношение кровоснабжения с изменением сократительной способности сердца и поглощением кислорода проведено на 25 изолированных сердцах животных. Коронарные сосуды изолированного сердца перфузировали кровью кошки-донора через аортальную канюлю с помощью насоса постоянной производительности. Об изменениях сопротивления коронарных сосудов судили по сдвигам в них перфузионного давления. Изменения оттока из коронарных сосудов, перфузируемых постоянным объемом крови, отражали сдвиги емкости сосудистого русла сердца. Поскольку емкость органного сосудистого русла определяется преимущественно его венозным отделом, увеличение или уменьшение ее отражает соответствующие изменения просвета венозных сосудов сердца. Подробно методика извлечения сердца, перфузии его и регистрации оттока из коронарных сосудов описана ранее [9].

Кровь, оттекавшую из коронарных сосудов, отводили через широкие катетеры, вставленные в первый и левый желудочки. С помощью двух стеклянных проточных кювет с укрепленными на них датчиками оксигемографов типа 036 М регистрировали насыщение кислородом артериальной крови донора и венозной коронарной крови, оттекавшей из правой половины сердца. С помощью аналоговых вычислительной машины МН-7 определяли артериовенозную разницу содержания  $\text{HbO}_2$ ; изменение ее величины в условиях перфузии коронарных сосудов постоянным объемом крови отражало изменение поглощения  $\text{O}_2$  миокардом. Кровь, циркулирующая в системе, подогревали ультратермостатом до  $37-38^\circ\text{C}$ .

Влияние пропранолола (67 опытов) и понахлазина (60 опытов) на функцию миокарда изучали в опытах на сердце *in situ*. Регистрировали напряжение миокарда (НМ) с помощью тендометрического датчика, подшиваемого к желудочку, пульсовое

давление в аорте и давление в левом желудочке (ЛЖД). Для оценки колебаний конечного диастолического давления в левом желудочке (КДД) сигнал ЛЖД усиливали и срезали на 20 мм рт. ст. электронным путем на АВМ МН-7. Определяли позитивную  $dp/dt$ , которую получали дифференцированием ЛЖД с помощью АВМ МН-7. Вычисляли индекс Верагута. Сдвиги давления в сосудах регистрировали электроманометрами типа ИД-2 с датчиками на механотронах.

Пропранолол, блокатор  $\beta$ -адренорецепторов (обзидан, ГДР), вводили одномоментно в дозах 0,001; 0,01 и 1 мг; первые две дозы и адреналин (1 мкг) — в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Внутрикоронарную инфузию пропранолола со скоростью 0,5 мг/мин и адреналина — 5 мкг/мин осуществляли автоматическим инъектором (опыты поставлены на 18 сердцах). Нонахлазин (СССР), оказывающий стимулирующее воздействие на  $\beta$ -адренорецепторы, вводили в дозе 1,2 мг/кг (опыты поставлены на 8 сердцах). По химическому строению наонахлазин представляет собой 10' [1,4-диазобинцикло-(4,3,0)-нонанил-4) пропионил]-2-хлорфенотиазин-гидрохлорид [10]. Препараты инъекцировали в приводящую магистраль перфузионного насоса. Контрольное внутрикоронарное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия или инфузия его со скоростью 0,5 мл/мин не оказала существенного влияния на сосуды и деятельность сердца.

Блокаду  $\alpha$ -адренорецепторов осуществляли введением дигидроэрготоксина (ДГ-эрготоксин, «СПОФА», Польша) или фентоламина («Regitin», СВА) в дозе 1 мг. Опыт проводили на половозрелых кошках и котах с массой 3,5—4,5 кг, наркотизированных раствором уретана (500 мг/кг) и хлоралозы (50 мг/кг). Полученные данные обработаны статистически с использованием разностного метода и критерия Стьюдента.

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Одномоментное внутрикоронарное введение пропранолола вызывало первоначальное кратковременное снижение тонуса коронарных артерий с последующим длительным его повышением (рис. 168), причем с увеличением дозы фазы коронародилатации и коронароконстрикции становились более выраженными. Пропранолол вызвал увеличение емкости сосудистого русла сердца, т. е. расширение венозных сосудов. Следует отметить, что расширение коронарных артерий возникало раньше, чем изменение силы и частоты сердечных сокращений, поглощение  $O_2$  миокардом. Наоборот, увеличение сопротивления коронарных артерий протекало на фоне снижения функциональной активности сердца и интенсивности метаболизма в миокарде. Изменение зависело от дозы.

Инфузия пропранолола вызывала качественно тот же эффект, что и одномоментное введение (рис. 169). Однако сопротивление

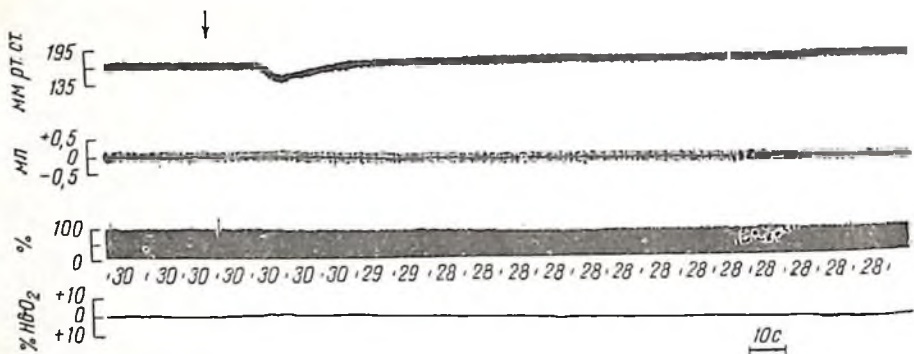


Рис. 168. Эффект внутрикоронарного введения пропранолола. Стрелкой вверх обозначен момент введения 0,1 мг пропранолола. Сверху вниз: перфузионное давление в коронарных артериях (мм рт. ст.), венозный отток (мл), напряжение миокарда (% от исходного уровня), артериовенозная разница содержания  $O_2$  в коронарной крови (%  $HbO_2$ ). Цифрами представлено число сердцебиений за 10 с.

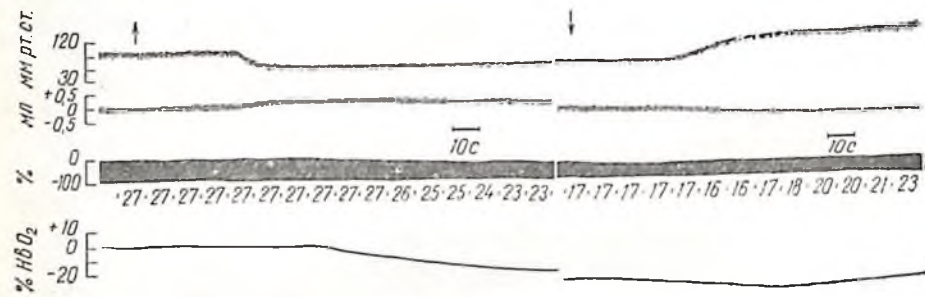


Рис. 169. Внутрикоронарная диффузия пропранолола. Обозначение те же, что на рис. 168. Стрелка вверх — начало диффузии, стрелка вниз — прекращение диффузии.

коронарных артерий, снизившись в начале диффузии, оставалось ниже исходного уровня в течение всего ее периода. Прекращение диффузии пропранолола во всех опытах привело к резкому увеличению сопротивления, превышающему исходный, до начала диффузии, уровень.

В условиях блокады  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов диффузия пропранолола вызывала более выраженную коронародилатацию по сравнению с реакцией при диффузии до их блокады ( $36,0 \pm 5,6$  и  $18,4 \pm 2,6\%$  соответственно), тогда как коронаростеноз, наоборот, была менее выраженной ( $26,5 \pm 4,3$  и  $41,8 \pm 6,7\%$  соответственно). Следовательно, в увеличении тонуса коронарных артерий при блокаде  $\beta$ -адренорецепторов определенная роль принадлежит  $\alpha$ -адренорецепторам.

Нонахлазин, введенный внутрикоронарно, также вызвал двухфазное изменение сопротивления коронарных артерий: первоначальное снижение сопротивления, сменяющееся его повышением.

Сопротивление коронарных артерий в среднем снизилось на  $44,8 \pm 2,18\%$ , возросло на  $33,9 \pm 0,3\%$ . Емкость коронарного русла уменьшилась в среднем на  $0,59 \pm 0,15$  мл. Понахлазин понижал частоту (на  $13,8 \pm 6,9\%$ ) и силу (на  $36,4 \pm 9,3\%$ ) сердечных сокращений, уменьшал потребление кислорода миокардом (на  $11,4 \pm 0,9\%$ ). Спустя 3—5 мин отмечался умеренный положительный инотропный эффект (в среднем на  $22,8 \pm 15,8\%$ ).

Таким образом, как пропранолол, так и понахлазин при внутривенном введении вызывают двухфазное изменение тонуса коронарных артерий, первоначальную коронародилатацию, сменяющуюся коронароконстрикцией. В отличие от пропранолола понахлазин уменьшал емкость коронарного русла, т. е. суживал венозные сосуды сердца. Различие отмечено и в действии на функциональную способность миокарда: понахлазин вначале понижал, а затем увеличивал сократимость миокарда, тогда как пропранолол только понижал сократимость сердечной мышцы.

Снижение коронарного сопротивления, вызываемое пропранололом, не могло быть обусловлено уменьшением экстравазкулярной компрессии сосудов сердца, поскольку изменение сопротивления происходило еще до того, как возникло уменьшение силы и частоты сердечных сокращений. Коронародилатация не была связана и со специфическим блокирующим действием пропранолола на  $\beta$ -адренорецепторы, поскольку выключение их этим препаратом усиливает эффект воздействия циркулирующих в крови допора и в перфузионной системе катехоламинов на  $\alpha$ -адренорецепторы. В соответствии с имеющимися данными [11—14] это может привести к констрикции, но не к дилатации коронарных артерий. Кроме того, дилатация коронарных артерий при действии пропранолола наблюдалась и в условиях блокады  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов. Это позволяет сделать вывод, что дилатация коронарных артерий при введении в них пропранолола была обусловлена непосредственным воздействием его на гладкую мускулатуру сосудов. Этот вывод подтверждают данные авторов [15], наблюдавших коронародилатацию при введении не только dl- и l-форм пропранолола, обладающих  $\beta$ -блокирующим свойством, но и d-пропранолола, который их практически лишен.

В проведенных опытах обратил на себя внимание тот факт, что хотя в период инфузии пропранолола и могло происходить постепенное повышение сопротивления коронарных сосудов, однако резкое его увеличение наблюдалось лишь после прекращения введения вещества. Это повышение сопротивления не могло быть обусловлено изменением экстравазкулярной компрессии коронарных сосудов или обменных процессов в сердце, поскольку оно происходило на фоне еще не изменившихся силы и частоты сердечных сокращений, а также поглощения кислорода миокардом. Уменьшение сократительной активности сердца в период поступления пропранолола в коронарные сосуды могло приводить к ослаблению его метаболизма. Можно предположить,

что в период инфузии пропранолола констрикторный эффект уменьшения метаболических коронародилататорных влияний в той или иной степени компенсировался непосредственным дилататорным влиянием пропранолола на коронарные сосуды. Прекращение же инфузии демаскировало этот эффект, в результате чего возникало резкое повышение тонуса коронарных сосудов, который приходил в соответствие с существующим в тот момент уровнем метаболизма в миокарде.

В отличие от пропранолола коронародилатация, возникающая при введении нонахлазина, протекала на фоне уменьшения функциональной активности миокарда и потребления им кислорода, что указывает на снижение метаболических коронародилататорных влияний. Последнее способствует проявлению коронароконстрикции, а не коронародилатации. Следовательно, вызываемая нонахлазином дилатация коронарных артерий обусловлена прямым действием препарата на стенку сосудов. В то же время нельзя исключить возможное участие в формировании коронародилатации феномена снижения экстраваскулярной компрессии сосудов, поскольку дилатация сопровождалась снижением сократимости миокарда.

В заключение по программе экспериментов, проведенных на изолированных сердцах животных, следует привести данные о выявленном различии в инотропной и хронотропной реакциях сердца на блокаду и стимуляцию  $\beta$ -рецепторов. Пропранолол в дозе 0,001 мг фактически не повлиял на положительный инотропный эффект адреналина ( $69,9 \pm 20,1\%$  до и  $67,9 \pm 13,2\%$  после пропранолола); хронотропный эффект был уменьшен на  $11,5 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,01$ ). В дозе 0,01 мг пропранолол ограничивал положительный эффект адреналина, однако недостоверно ( $p > 0,05$ ). Наоборот, хронотропный эффект был уменьшен на  $21,3 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,01$ ). Способность адреналина увеличивать потребление  $O_2$  миокардом была достоверно снижена в обоих случаях (на  $17,9 \pm 5,3$  и  $21,3 \pm 3,8\%$  соответственно). Все изложенное совпадает с данными опытов [16], в которых на мышечных полосках из предсердия и папиллярной мышцы также было обнаружено, что пропранолол в несколько большей степени ограничивал положительный инотропный эффект катехоламинов, чем хронотропный. Введение 0,1 мг пропранолола на фоне повышенного содержания адреналина в крови сопровождалось более выраженным отрицательным инотропным эффектом, по разнице недостоверно ( $p > 0,1$ ). Наоборот, отрицательный хронотропный эффект пропранолола в этих опытах был сильнее (на  $14,9 \pm 3,9\%$ ;  $p < 0,01$ ), что также ассоциировалось с большим снижением потребления  $O_2$  миокардом. Адреналин, как правило, повышающий силу и частоту сердечных сокращений, в обычных условиях при введении на фоне инфузии пропранолола вызывал урежение сердечных сокращений (на  $12,2 \pm 2,9\%$ ;  $p < 0,001$ ) и достоверное увеличение их силы ( $p < 0,001$ ). Характерно, что до пропранолола адреналин увели-

чивал потребление  $O_2$  миокардом в среднем на  $38,8 \pm 1,8\%$ , на фоне этого препарата — на  $0,77 \pm 0,45\%$ .

Таким образом, согласно приведенным данным, существует определенное различие в инотропной и хронотропной реакциях сердца на адренергическое воздействие. Весьма важно, что при определенной степени блокады  $\beta$ -адренорецепторов может значительно ограничиваться положительный хронотропный эффект адренергической стимуляции, тогда как выраженность положительного инотропного действия существенно не изменяется. Изменение поглощения сердечной мышцей  $O_2$  наиболее тесно связано с нарушением частоты сердечных сокращений, что имеет важное значение в аспекте расшифровки атипичного механизма  $\beta$ -адреноблокаторов.

Эксперименты в условиях изолированного сердца позволяют осветить вопрос о взаимоотношении кровотока в миокарде с его функцией. Однако функциональное состояние мышцы тесно связано с центральной гемодинамикой. В связи с этим были проведены опыты на сердце *in situ*. Внутривенное введение пропранолола в дозах 0,03; 0,05; 0,07 мг/кг вызывало снижение силы и частоты сердечных сокращений, системного артериального давления и увеличение центрального венозного давления; отмечена тенденция к зависимости эффектов от дозы. Нопахлазин при внутривенном введении в дозе 5—6 мг/кг вызывал кратковременное снижение сократимости миокарда, сменявшееся длительным увеличением функциональной активности миокарда и гипертензией. Наибольшие изменения отмечались на 15-й минуте после введения, что соответствует моменту накопления порадrenalина в миокарде под влиянием нопахлазина [10, 17]. Исходя из направленности действия препаратов, можно ожидать, что характер и выраженность их влияния на сердечно-сосудистую систему зависят от адреносимпатического фона. Введение пропранолола (0,07 мг/кг) на фоне повышенного содержания адреналина в крови (инфузия 5 мкг/мин) сопровождалось менее выраженным снижением показателей сократимости, чем в контроле ( $45,8 \pm 3,8$  и  $57,5 \pm 5,3\%$  соответственно). При введении нопахлазина (6 мг/кг) на фоне инфузии порадrenalина зарегистрировано выраженное увеличение сократимости миокарда; фаза снижения отсутствовала вообще.

Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние блокаторов и стимуляторов  $\beta$ -адренорецепторов на функцию миокарда и систему кровообращения в целом зависит от исходной адреносимпатической активности организма и, возможно, от функционального состояния адренорецепторов. Это предположение подтверждают опыты на десимпатизированных животных. Предварительное введение им орнида сопровождается уменьшением содержания порадrenalина в синаптической «щели», т. е. снижением адреносимпатической активности организма. Нопахлазин в этих условиях дал более выраженный и более длительный отрицательный

инотропный эффект. Отрицательное влияние понахлазина на функцию миокарда значительно усилилось как по степени выраженности, так и по продолжительности при введении препарата на фоне блокады  $\beta$ -адренорецепторов, что делает сомнительным целесообразность их сочетанного применения.

Сравнительная оценка выраженности фазы отрицательного инотропного действия понахлазина при различных условиях его введения дана в табл. 49, из которой видно, что фаза отрицательного хротропного и инотропного действия понахлазина была усилена у десимпатизированных животных и в еще большей степени на фоне блокады  $\beta$ -адренорецепторов.

ТАБЛИЦА 49

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЫРАЖЕННОСТИ ФАЗЫ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ИНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОНАХЛАЗИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА

Регистрируемые параметры	Контроль	Орвид+по- нахлазин	Пропранолол+ понахлазин
Частота сердечных сокращений	$-2,12 \pm 1,03$	$-6,29 \pm 0,49$	$-14,31 \pm 1,7$
Индекс сократимости Верагута	$-4,72 \pm 1,84$	$-20,18 \pm 1,8$	$-41,8 \pm 1,91$
Напряжение миокарда	$-5,67 \pm 0,12$	$-57,35 \pm 15,21$	$-34,28 \pm 7,32$
Конечное диастолическое давление в левом желудочке	$16,15 \pm 3,47$	$25,2 \pm 5,48$	$47,42 \pm 1,95$
Аортальное диастолическое давление	$-16,46 \pm 4,07$	$-30,63 \pm 2,91$	$-16,23 \pm 1,9$
Длительность отрицательного инотропного эффекта (по индексу Верагута), мин	3—4	12—15	Более 30

Примечание. Даны максимальные отклонения величин регистрируемых параметров в процентах к исходному.

## ВЫВОДЫ

1. Пропранолол и понахлазин при внутрикоронарном введении вызывают первоначальное снижение тонуса коронарных артерий с последующим его повышением. Коронародилатация служит проявлением прямого неспецифического воздействия препаратов на стенку артерии. В отличие от пропранолола понахлазин суживает венозные коронарные сосуды.

2. Коронародилатация, вызываемая пропранололом, сохраняется по мере поступления вещества в кровеносное русло, что является новым фактом в спектре фармакологического действия препарата. Коронароконстрикция обусловлена как активацией  $\alpha$ -адренорецепторов в условиях выключения  $\beta$ -адренорецепторов,

так и уменьшением метаболических коронародилататорных влияний.

3. Пропранолол оказывает отрицательное инотропное и хронотропное действие; нонахлазин вызывает первоначальное кратковременное снижение сократимости миокарда, сменяющееся продолжительным увеличением. Действие препаратов на функцию миокарда и систему кровообращения зависит от исходной активности адреносимпатической системы организма.

4. Сдвиг в поглощении миокардом кислорода наиболее тесно связан с изменением частоты сердечных сокращений, что, вероятно, является ведущим механизмом антиангинального действия  $\beta$ -адреноблокаторов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мясников Л. А., Красникова Ю. А., Николасва Е., Григорьянц Р. А. Клинический эффект и изменения гемодинамики при применении препарата нидерал. — Кардиология, 1967, 7, 67—72.
2. Мясников Л. А., Метелица В. И. Возможности дифференцированного лечения хронической формы ишемической болезни сердца. — Тер. арх., 1973, 45, 6, 8—21.
3. Billimoria A. K., Naveliwala H. K., Volka I. K., Shan S. I. Propranolol in angina pectoris. — Ind. Heart J., 1972, 24, 1, 20—24.
4. Сивков И. И., Кукес В. Г., Зиссельман С. Б. и др. Клиническое применение некоторых блокаторов адренергических  $\beta$ -рецепторов. — Клини. мед., 1974, 52, 6, 51—56.
5. Комаров Ф. И., Ольбинская Л. И., Абиндер А. А. и др. Стимуляторы  $\beta$ -адренергических структур в терапии больных ишемической болезнью сердца. — Кардиология, 1975, 7, 37—43.
6. Хамидова М. Х., Ахмедова Ф. А., Гитин И. Я., Холматов В. Х. Отечественный блокатор анаприлин в лечении больных ишемической болезнью сердца. — Мед. журн. Узбекистана, 1975, 11, 8—10.
7. Шхацабая Н. К. Терапия хронической ишемической болезни сердца в свете данных о патофизиологии коронарного кровообращения. — Кардиология, 1975, 7, 5—15.
8. Замотаев И. И., Лозинский Л. Г., Саидохирский Б. Л., Максимова Л. И. Сравнительная оценка клинического действия ряда  $\beta$ -адренергических блокаторов. — Кардиология, 1976, 4, 75—81.
9. Ткаченко В. И., Дворецкий Д. И., Овсянников В. И. и др. Регионарные и системные вазомоторные реакции. — Л.: Медицина, 1971.
10. Касерина И. В., Маркова Г. А., Чичканов Г. Г. и др. Нонахлазин — новый препарат для лечения ишемической болезни сердца. — Кардиология, 1975, 7, 43—48.
11. Gaal P. G., Kattub A. A., Kolin A., Ross G. Effects of adrenaline and norepinephrine on coronary blood flow before and after beta-adrenergic blockade. — Brit. J. Pharmacol., 1966, 26, 713—722.
12. Boha O. S. Adrenergic receptors in coronary arteries. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 139, 799—807.
13. Овсянников В. И. Влияние катехоламинов на сопротивление и емкость коронарных сосудов до и после блокады их адренорецепторов. — Физиол. журн. СССР, 1972, 58, 9, 1415—1423.
14. Орлова И. И. Коронарное кровообращение в условиях  $\beta$ -адренергической блокады. — Кардиология, 1978, 8, 93—97.
15. Whitsitt L. S., Lucchesi B. R. Effect of propranolol and its stereoisomers upon coronary vascular resistance. — Circulat. Res., 1967, 19, 305—317.



16. *Blinbs I. R.* Evaluation of the cardiac effects of several beta adrenergic blocking agents.—Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 139.
17. *Каверина Н. В., Григлевский Р., Басаева А. И.* и др. К механизму действия поахлазина на кровоснабжение и деятельность сердца. — Бюлл. экспер. биол., 1975, 80, 11, 48—50.

УДК 616.127-005.8-092.9-085.355:577.152.112]-07:[616.127-091.8+616.127-008.1

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА С НА РАЗЛИЧНЫЕ ЗОНЫ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ

К. А. ЗУФАРОВ, Р. А. КАЦЕНОВИЧ, Ш. Б. ИРГАШЕВ,  
М. Ф. ХУДАЙБЕРДЫЕВА, К. Н. АЗИЗОВ (СССР)

### ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с современными представлениями лечение инфаркта миокарда должно быть комплексным и направленным на различные звенья патологического процесса. В настоящее время применяется огромное число препаратов, поэтому при комплексном подходе к лечению данного заболевания необходимо ясно представлять механизм обособленного действия каждого из них. Известно, что при нарушении коронарного кровообращения в патологический процесс вовлекается не только область ишемии, но и весь миокард; отсюда существенным является особенность течения заболевания в различных его участках [1—3, 5].

Для поддержания метаболизма на уровне, обеспечивающем выживаемость миокардиальных клеток, наряду с мерами по увеличению доставки кислорода важное значение имеет стимуляция способности клетки к максимальной утилизации кислорода путем активации окислительно-восстановительных ферментных систем. Определенную роль при этом играют естественные компоненты процессов окислительного фосфорилирования, представителем которого является цитохром С.

Многочисленные исследования показали, что при инфаркте миокарда существенно снижаются содержание цитохрома С и активность цитохромной системы [6—10]. Угнетение же ее происходит главным образом за счет убыли цитохрома С, а нормализация его уровня, вероятно, будет способствовать восстановлению активности этой системы [8], что может повлечь за собой образование богатых макроэргических соединений. В связи с этим изучение обособленного влияния цитохрома С в различных участках миокарда после его повреждения представляет определенный интерес, тем более что сравнительное исследование метаболических процессов в зоне некроза и неповрежденных участках миокарда под влиянием данного препарата не проводилось.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180—200 г. Инфаркт миокарда вызывали перевязкой психодящей ветви левой коронарной артерии. Препарат цитохрома С фирмы «Reanal» вводили внутривенно 2 раза в день по 5 мг на 1 кг массы в течение 30 сут. Животных забивали путем декапитации через 1, 3, 7, 15 и 30 сут после лечения. Контролем служили нелеченные животные с экспериментальным инфарктом миокарда, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия. Изучали также группу животных с неповрежденным миокардом. Всего было использовано 140 животных. Миокард исследовали в зоне некроза, который, как правило, локализовался на передней стенке левого желудочка в околоинфарктной зоне и задней стенке левого желудочка.

Материал, взятый для общеморфологического анализа, обрабатывали гематокселин-эозином, для электроно-микроскопических исследований фиксировали в глутаральдегиде с последующей обработкой в осмиевой кислоте и заливали в эпон.

Для радиологических целей применяли метионин- $H^3$ , который вводили за 4 ч до забоя, и выражали в импульсах в минуту на 1 мг белка миокарда зоны некроза и заднего желудочка и определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике В-mato II фирмы Beckman. Биохимическим методом изучали в зоне некроза и в задней стенке левого желудочка активность цитохромоксидазы и выражали в единицах оптической плотности на 1 мг влажной ткани и количество цитохрома С во влажной ткани в миллиграмм-процентах. Полярнографическим методом изучали дыхательный коэффициент в левом желудочке, включая зону некроза.

Кроме того, изучались ЭКГ в трех стандартных и трех усиленных отведениях от конечностей.

В некоторые сроки (15—30 сут) в зоне задней стенки левого желудочка планиметрически определяли площадь поперечного сечения кардиомиоцитов путем зарисовки контуров при общем увеличении 2900. В каждом случае вычисляли среднюю из 100 измерений и выражали в условных единицах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что течение инфаркта миокарда, особенно в зоне ишемии, характеризуется определенной стадийностью. Результаты наших наблюдений и данные других исследователей [2] свидетельствуют о значительных изменениях в ранние сроки как в зоне лигирования сосуда, так и в остальных участках миокарда. Уже в 1—3-и сутки отмечалась выраженная дистрофическая реакция с отеком стромы, потерей поперечной и продольной исчерченности миофибрилл, а в дальнейшем с зернистым и глыб-

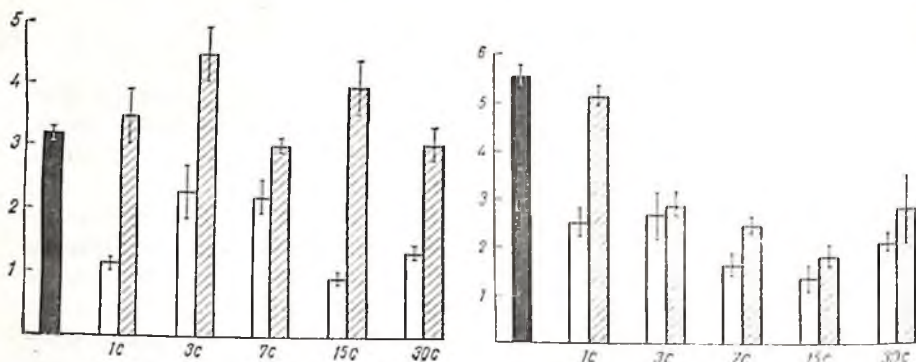


Рис. 170. Содержание цитохрома С в зоне некроза у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда.

По оси ординат — количество цитохрома С в миллиграммах на 100 г влажной ткани; по оси абсцисс — сроки эксперимента в сутках. Темный столбик — количество цитохрома С в миокарде левого желудочка интактных крыс; светлые столбики — количество цитохрома С в зоне некроза у крыс, не получавших цитохром С, заштрихованные столбики — количество цитохрома С в зоне некроза у крыс, получавших цитохром С.

Рис. 171. Активность цитохромоксидазы в зоне некроза у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда.

По оси ординат — активность цитохромоксидазы в единицах оптической плотности; по оси абсцисс — сроки эксперимента в сутках. Темный столбик — активность цитохромоксидазы в миокарде левого желудочка интактных крыс; светлые столбики — то же в зоне некроза у крыс, не получавших цитохром С, заштрихованные столбики — то же в зоне некроза у крыс, получавших цитохром С.

чатым распадом. Ультраструктура их говорит о наличии остатков клеточных структур — миофиламентов, митохондрий, расширения саркомерулярного аппарата, наблюдается появление элементов мезенхимального проихождения. В последующие сроки в период организации инфаркта миокарда происходят резорбция некротических масс, фибробластическая реакция с усилением коллагенизации и образование рубцовой ткани.

Биохимическое изучение цитохрома С и цитохромоксидазы показало значительное снижение их уровня в зоне некроза во все исследуемые сроки (рис. 170, 171); при этом наименьшее количество приходилось на 15-е сутки и составило 29,03% от исходного уровня. Уменьшалась и активность цитохромоксидазы во все исследуемые сроки с наименьшей активностью к 15-м суткам (26,37% от исходного уровня). Как считают некоторые авторы [8], угнетение цитохромоксидазы происходит главным образом за счет убыли цитохрома С, который является основным лимитирующим фактором в ней. Все эти изменения приводят к падению интенсивности окислительных процессов, так как известно, что в сердечной мышце в нормальных условиях 97% окислительных реакций завершаются с участием цитохромной системы [9].

Существенное значение в состоянии зоны некроза имеют ее периферические отделы, т. е. участки, прилегающие к области инфаркта, которые также подвергаются значительным изменени-

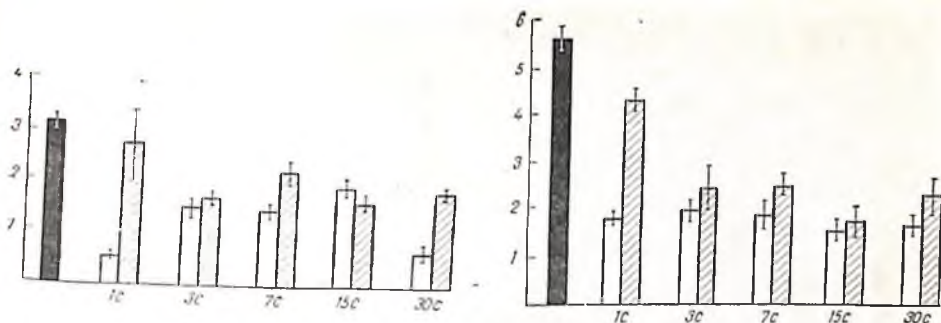


Рис. 172. Содержание цитохрома С в сердечной мышце левого желудочка у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда. Обозначения те же, что на рис. 171.

Рис. 173. Активность цитохромоксидазы в миокарде левого желудочка у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда. Обозначения те же, что на рис. 172.

ям и выражаются частичной атрофией мышц, нарушением внутривиточечных структур. Как показали наши результаты, а также данные других исследователей [3], состояние большинства мышечных клеток сходно с изменениями структуры в более ранние периоды развития инфаркта миокарда в зоне некроза. Небезучастной является и отдаленная от ишемии зона, где в различные сроки заболевания происходят морфологические нарушения вплоть до дистрофических и некробиотических изменений в отдельных мышечных волокнах и их группах с последующим развитием очагов кардиосклероза.

Биохимическое изучение дыхательных ферментов также показало снижение их содержания и активности во все исследованные сроки (рис. 172, 173).

Анализируя динамику экспериментального инфаркта миокарда, еще раз следует отметить неоднородность его развития в различных отделах миокарда. Естественно, при таких серьезных метаболических нарушениях весьма существенна фармакологическая коррекция течения данного заболевания. Как показывают полученные данные, при инфаркте миокарда наступают резкие изменения дыхательной цепи, что приводит к нарушению образования богатых энергией соединений и в первую очередь АТФ. Падение его синтеза отражается на сократительной способности миокарда, на пластическом обеспечении его функции, поэтому торможение или убыль компонентов дыхательной цепи является важнейшим механизмом нарушения функции сердца при инфаркте.

Введение экзогенного цитохрома С уже через 1—3 сут указывает на более благоприятную морфофункциональную картину. За счет увеличения количества гипертрофированных мышц, находящихся по периферии от некроза участков, эта зона несколько



Рис. 174. Миоцит в сохранившихся участках зоны некроза через сутки после лечения цитохромом С. Некоторые митохондрии (М) изменены. Хорошо выражена сарколема (S).  $\times 2300$ .

более ограничена, чем у контрольных животных; поперечная и продольная исчерченность миофибрилл сохранена. Отмечаются усиленная фибробластическая реакция и новообразование сосудов. Наряду с большей сохранностью кардиомиоцитов (рис. 174) имеются клетки, проявляющие активную внутриклеточную регенерацию в виде миобластических элементов. Они характеризуются большим числом гранул рибонуклеопротеидов и элементов шероховатого эндоплазматического ретикулума с появлением миофибрилл (рис. 175). Подобное состояние внутриклеточных структур служит определенной предпосылкой к гипертрофии клеток. Такая определенная положительная морфологическая картина отражается и на состоянии дыхательных ферментов. Как видно из рис. 170, количественное содержание цитохрома С уже в ранние сроки развития инфаркта миокарда у леченых животных показало увеличение его по сравнению как с интактными животными, так и в значительной степени с пелечеными крысами. Активность цитохромоксидазы, как видно из рис. 171, у ле-

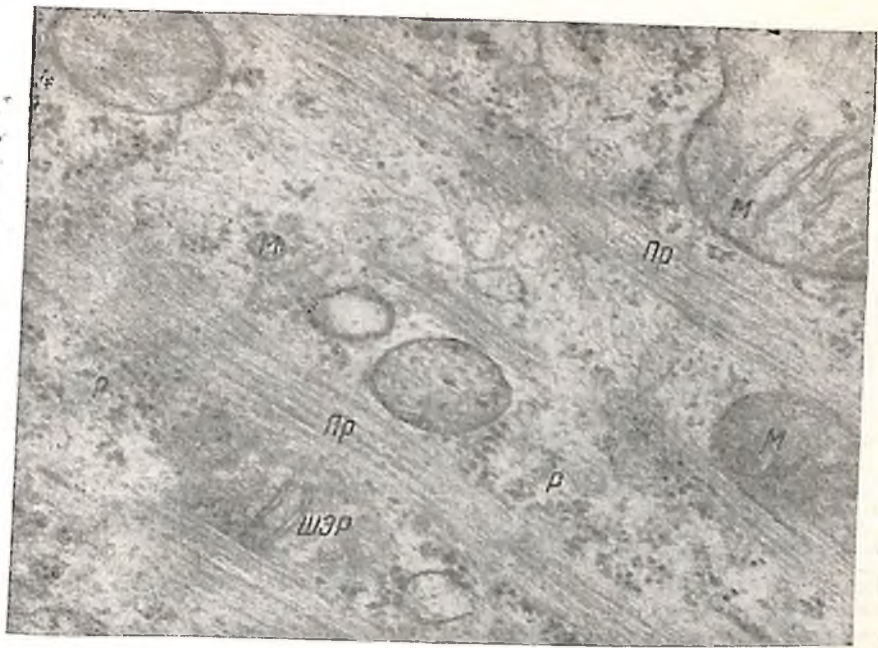


Рис. 175. Миобласт из зоны, прилегающей к очагу некроза через 3 сут после лечения цитохромом С. В цитоплазме много рибосом (Р), митохондрий (М) различной величины. Встречаются элементы шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР), а также пучки протофибрилл (ПР).  $\times 15\ 000$ .

ческих животных не достигает уровня интактных, однако выше, чем у нелеченых контрольных крыс.

Полирографическое изучение дыхательного коэффициента, указывающего на сопряжение окисления и фосфорилирования, также показало некоторое увеличение у леченых крыс и составило  $2,5 \pm 0,12$  ( $1,92 \pm 0,2$ ), а у интактных животных  $4,57 \pm 0,3$ .

Активация внутриклеточных структур, бурное развитие соединительнотканых элементов в начальные сроки развития инфаркта миокарда приводят к значительному увеличению включения меченого метионина в зоне некроза:  $157,2\%$  у леченых ( $157,6\%$  у нелеченых) от активности включения в миокарде интактных крыс (рис. 176). Как отмечают некоторые исследователи [11], усиление протеосинтеза в зоне инфаркта, по-видимому, первоначально наступает в ядрах, затем в митохондриях, микросомах, соединительнотканых элементах и сохранившихся мышечных клеток, но не распространяется на миофибрилярный аппарат. В задней стенке левого желудочка в ранние сроки развития инфаркта миокарда также происходит определенные дистрофические изменения, однако как светооптическая картина, так и ультраструктура указывали на большую сохранность и активацию внутриклеточных структур леченых животных.

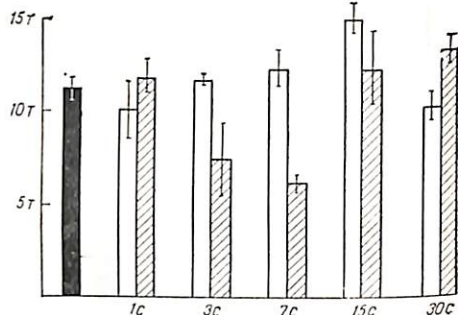
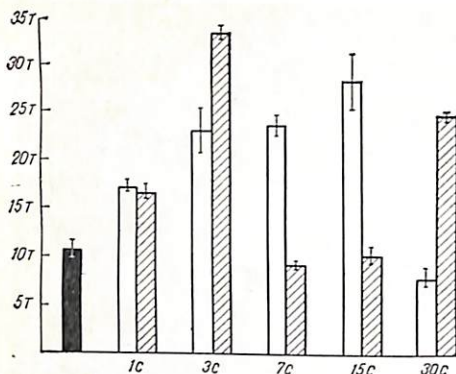


Рис. 176. Включение <sup>3</sup>H-метионина в суммарный белок зоны некроза у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда.

По оси ординат — включение <sup>3</sup>H-метионина в импульсах в минуту на 1 мг белка; по оси абсцисс — сроки эксперимента в сутках. Темный столбик — включение <sup>3</sup>H-метионина в интактный левый желудочек, светлый столбик — включение <sup>3</sup>H-метионина в зону некроза у крыс, не получавших цитохром С.

Рис. 177. Включение <sup>3</sup>H-метионина в суммарный белок сердечной мышцы левого желудочка.

Обозначения те же, что на рис. 177.

Незначительно увеличено по сравнению с интактными животными включение меченого метионина — 105,8% (89% у нелеченых). Немногочисленные наблюдения интенсивности протеосинтеза за пределами очага некроза по-разному характеризуют течение этого процесса. По мнению некоторых исследователей [9], интенсивность протеосинтеза в участках, не соприкасающихся непосредственно с областью некроза, не изменена, тогда как в пограничной зоне включение меченых аминокислот в белки миокарда заметно усилено.

У леченых животных биохимическое изучение дыхательных ферментов указывало на повышение их активности по сравнению с нелечеными животными (см. рис. 172, 173).

В стадии организации инфаркта миокарда, которая длится у крыс, как известно, от 7 до 30 сут, у леченых животных наряду с ускоренным развитием рубца были значительно выражены регенераторные процессы в сохранившихся кардиомиоцитах в зоне некроза и в особенности в околоинфарктных участках, где по-прежнему являлось большое количество гипертрофированных митохондрий и миофибриллярных структур, увеличилось число гранул гликогена и рибосом, эндотелий сосудов с большим количеством пиноцитозных вакуолей (рис. 177, 178).

Изменения в отдаленных от зоны некроза участках левого желудочка у леченых животных носят незначительный характер и выражаются в большей сохранности и активации внутриклеточных структур в ранние сроки, а в поздние (15—30-е сутки)

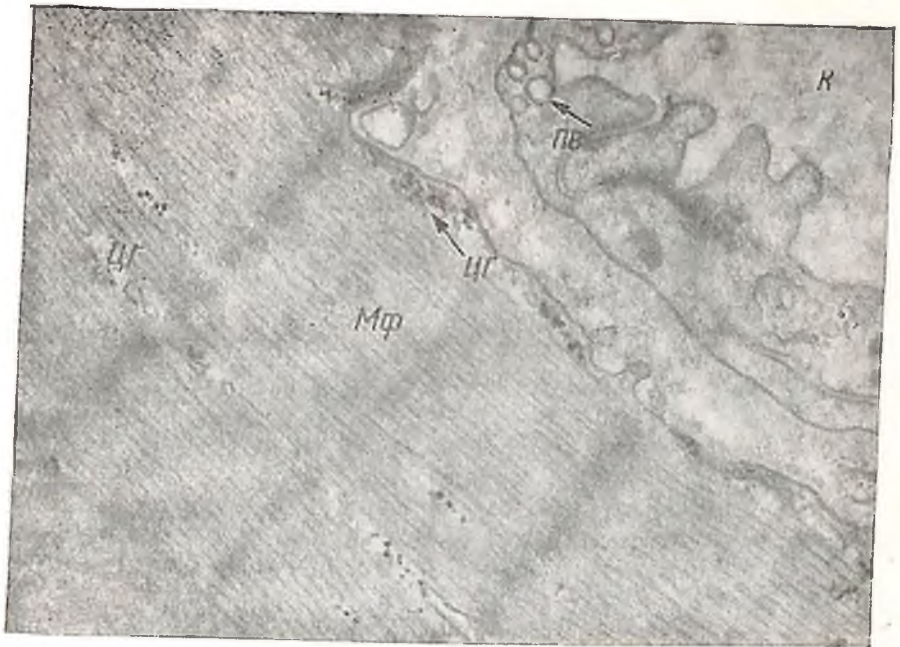


Рис. 178. Околонифарктная зона через 7 сут после лечения цитохромом С. Капилляр (К) в состоянии повышенной функциональной активности с пиноцитозными вакуолями (ПВ) в цитоплазме. Миофибриллы (МФ) содержат много цитогранул (цг).  $\times 26\ 300$ .

свидетельствуют о гипертрофии кардиомиоцитов. Это подтверждают наши планиметрические данные. Так, уже на 15-е сутки у леченых животных средние показатели размеров поперечного сечения кардиомиоцитов задней стенки левого желудочка составляют  $13,6 \pm 0,29$  против  $8,9 \pm 0,3$  в контроле; гистограмма резко отличается от нормы, в ней становится очевидным сдвиг вправо. Это происходит за счет уменьшения числа мелких и увеличения числа крупных клеток. К 30-м суткам планиметрическая картина примерно аналогична.

Радиологическое изучение зоны некроза у леченых животных показало сначала снижение, а затем на 30-е сутки повышение включения меченой аминокислоты, что свидетельствует, по-видимому, о более адаптивном (в плане последующей компенсации) протеосинтезе у леченых животных (см. рис. 176). Увеличиваются также содержание цитохрома С и активность цитохромоксидазы во все сроки организации инфаркта миокарда (см. рис. 170 и 171). Аналогичная картина в участках отдаленных от зоны некроза (рис. 179, а также см. рис. 172, 173).

Положительную динамику мы наблюдали и на ЭКГ, которая была ускорена у леченых животных. Так, приближение сегмента



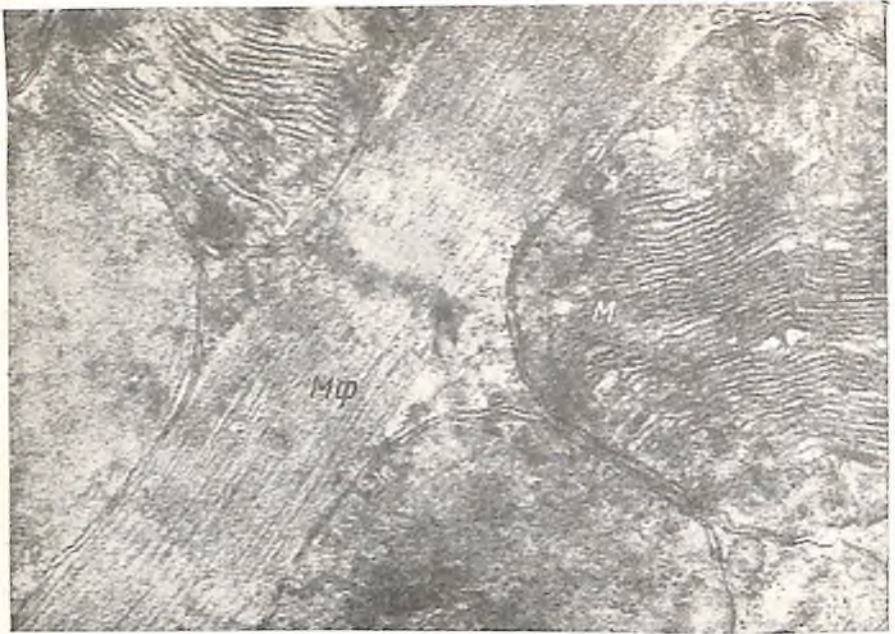


Рис. 179. Околонифарктная зона через 15 сут после лечения цитохромом С. Гипертрофия митохондрий (М) и миофибрилл (Мф).  $\times 33\,300$ .

$S-T$  к изолинии выражено у леченых животных; отмечается ускорение формирования отрицательного зубца, который характеризует подострую ЭКГ стадию инфаркта миокарда. У леченых животных отрицательный зубец  $T$  формируется к 3-м суткам, тогда как в контроле — только к 7-м. В последующие сроки у леченых животных происходит сглаживание этого зубца в отведениях I и aVL. Отмечается, что зубец  $Q$ , особенно в I отведении, у леченых животных на 15—30-е сутки выражен меньше по сравнению с нелечеными. Все это свидетельствует о положительной динамике ЭКГ.

Таким образом, экзогенный цитохром С, являясь конечным звеном окислительного фосфорилирования, достаточно благоприятно влияет на течение экспериментального инфаркта миокарда у крыс. Зона некроза, которая, как правило, считается обреченной и заживает рубцом, характеризуется не только ускоренным развитием соединительнотканых элементов, но и значительным сохранением кардиомиоцитов, расположенных в основном на периферии от некроза, которые гипертрофируются, что благоприятно действует на функциональные возможности сердца в целом. Естественно, этому способствует благоприятная морфофункциональная картина оставшихся участков левого желудочка.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вайль С. С.* Функциональная морфология нарушения деятельности сердца. — М.: Медгиз, 1960.
2. *Стручков А. П., Лушников Е. Ф., Горняк К. А.* Гистохимия инфаркта миокарда. — М.: Медицина, 1967.
3. *Митин К. С.* Электронномикроскопический анализ изменений сердца при инфаркте. — М.: Медицина, 1974.
4. *Чечулин Ю. С.* Поврежденное сердце. — М.: Медицина, 1975.
5. *Хехт А.* Введение в экспериментальные основы современной патологии сердечной мышцы. — М.: Медицина, 1975.
6. *Маюйлов С. Е., Фирсова В. П.* Содержание цитохрома С в сердечной мышце при острой гипоксии. — В кн.: Биофизические основы патологического состояния мышц и энергетическое обеспечение сократительного аппарата. Тбилиси, 1973, с. 146—148.
7. *Фролькис Р. А.* Некоторые компоненты дыхательной цепи сердечной мышцы при экспериментальном инфаркте миокарда у собак. — *Вопр. мед. химии*, 1968, вып. 3, с. 302—306.
8. *Фетисова Т. В., Фролькис Р. А.* Биохимия инфаркта миокарда. — Киев: Здоров'я, 1976.
9. *Challoner D. R.* Respiration in Miocardium.—*Nature*, 1968, 217, 78—79.
10. *Gudbjarnason S., Fenton J., Wolf I. et al.* Stimulation of reparative processes following experimental myocardial infarction.—*Arch. intern. Med.*, 1966, 118, 33—40.
11. *Bing R.* Reparative processes in heart muscle following myocardial infarction.—*Cardiology*, 1972, 56, 1—6, 314—324.

UDC 612.172.015.3+616.127-008.9:061.3(47+73) 1979 (082)

**Metabolism of the Myocardium.** Proceedings of the 4th Soviet-American Symposium, September 14—16, 1979, Tashkent (USSR) /Edited by E. I. CHAZOV (USSR), CH. E. MORGAN (USA) (Joint USSR-USA edition). M.: "Meditsina", 1981, pp. ill.

The collection presents the results of collaborative investigations of Soviet and American scientists in the most important fields of experimental cardiology. Special attention is given to the role of calcium ions in regulation of the myocardium and skeletal muscle contraction, mechanisms of energy metabolism in the myocardial structures. Considerable space is allotted to the works dedicated to regulation of metabolism in the cardiac cells and vessels by hormones, prostaglandins, lipid peroxidation products, cyclic nucleotides. Data of studies into the nitrogenous and protein metabolism in the myocardium are also included. A number of reports deal with morphological changes occurring in the myocardium in partial and full ischemia. Of much interest are findings of the tests aimed at discovering new ways of transport of drugs in therapy of cardiovascular diseases.

The book is intended for medical men, biologists, biochemists and chemists interested in pressing problems of fundamental and applied cardiology.

The book contains 179 drawings, 49 tables; references—715 titles.

ИБ № 2894

## МЕТАБОЛИЗМ МИОКАРДА

Научный редактор *Д. О. Левицкий*  
Художественный редактор *Т. М. Смага*  
Переплет художника *Л. Д. Виноградовой*  
Технический редактор *А. М. Миронова*  
Корректор *Т. Р. Твритнева*

Сдано в набор 27.10.80. Подписано к печати 30.12.80. Т—22933.  
Формат бумаги 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бум. тип. № 1. Обыков. гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 23,50. Усл. кр.-отг. 23,75. Уч.-изд. л. 26,28. Тираж 5000 экз. Заказ 1009. Цена 2 р. 60 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина», Москва, Петровверигский пер., 6/8

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, Москва, 113105, Нагатинская, 1.

## К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Из плана выпуска литературы издательства «Медицина» на 1981 год:

Ежегодник по кардиологии, 1979: Пер. с англ./Под ред. В. П. ХАРВЕЯ и др. — М.: Медицина, 1981 (IV кв.).—31 л., ил. — Пер. изд.: США, 1979. — В пер.: 2 р. 60 к. 10 000 экз.

Ежегодник «Кардиология» представляет собой сборник сокращенных статей, опубликованных в 1978 г. в различных зарубежных медицинских журналах. Статьи посвящены важным разделам в кардиологии, таким, как исследования функции сердца в норме и при патологии, болезни сердца и сосудов у детей, поражения миокарда, эндокарда и перикарда у взрослых, сердечно-сосудистая хирургия, ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертония. Поскольку книга прежде всего предназначена для практикующих клиницистов, особое внимание в ней уделяется вопросам клиники, диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Выделение особого раздела «Вопросы для клиницистов», а также редакторские комментарии, сопровождающие каждую статью, делают сборник удобным в повседневной врачебной деятельности.

Для терапевтов и кардиологов.

Книги издательства «Медицина» поступают для продажи в специализированные книжные магазины и магазины, имеющие отделы медицинской литературы.

Издательство «Медицина» распространением литературы не занимается.

