

УДК 615.217.24:577.3:611.73

Н. И. Путилин, А. Г. Козлов, Ю. Ю. Меньших,
В. И. Завьялов, Г. С. Пекач

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ИЗОПРЕНАЛИНА НА ЭНЕРГОТРАТЫ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

Адренергическая регуляция является, по-видимому, наиболее эффективным способом мобилизации энергообмена мышц в процессе их деятельности. В то же время становится все более очевидным, что знание механизмов такой регуляции не может быть полным без данных о влиянии катехоламинов на энерготраты мышцы в форме механической работы и тепла. Важно также подчеркнуть, что такой анализ может быть особенно интересен в плане изучения функциональных состояний мышц и прежде всего — состояния утомления.

Скелетные мышцы холоднокровных представляют собой удобную модель такого изучения адренергической регуляции энергообмена. Это обусловлено прежде всего тем, что гликогенолиз, лимитируемый фосфорилазой, является здесь ведущим источником энергии, а адренергическая регуляция реализуется в значительной степени именно путем активации этого фермента.

Использование методики прямой калориметрии изолированных скелетных мышц, позволило нам оценить общий характер энерготрат и их эффективность при различных условиях их функционирования [2, 7]. В предыдущей работе [3] были представлены фактические данные о влиянии бета-адреномиметика изопреналина (I) на теплопродукцию, работоспособность и эффективность энерготрат. Для уточнения механизмов действия указанного агониста на мышцу представляется необходимым провести кинетический анализ влияния I на энерготраты работающей скелетной мышцы.

Методика исследований

Были поставлены опыты с концентрациями изопреналина $5 \cdot 10^{-9}$; $5 \cdot 10^{-8}$ и $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл, согласно ранее описанной методике [3]. Анализировали следующие показатели энерготрат мышцы при ее работе до начала утомления (появление контрактуры) и до полного утомления Q/P_m — удельная теплопродукция, A/P_m — удельная работоспособность и Q/A — калорический коэффициент работы, где Q — теплопродукция, сопровождающая работу A мышцы, имеющей вес P_m . С учетом результатов предыдущей работы [3] имеется возможность проанализировать действие I в ряде концентраций $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-9}$ г/мл и 0 (контроль). Достоверность отличия от контроля определяли с помощью критерия Стьюдента. В работе принят уровень достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

В таблице представлены данные о зависимости «доза — эффект». В качестве эффекта представлены A/P_m , Q/P_m , Q/A . Эти зависимости по всем показателям имеют нелинейный характер с экстремумами при концентрациях $5 \cdot 10^{-8}$ и $5 \cdot 10^{-9}$ г/мл.

Среди возможных причин отмеченной нелинейности могут быть: а) кооперативные эффекты на адренорецепторах [5]; б) десенситизация высокими дозами исследуемого катехоламина [9, 14].

Учитывая мономерность бета-адренорецепторов [1], для которых I является специфическим активатором, причиной указанной нелинейности следует считать десенситизацию.

Явление десенситизации, проявившееся в форме уменьшения A/P_m и Q/P_m при увеличении концентрации I , идентично явлению субстрат-

Анализ действия из

ного ингибирования
онального сходс
11, 12], соответ
Ариенса и теории
методов анализа
Опишем по
тен, учитывающе

где Y — величина
 K_m — кажущаяся

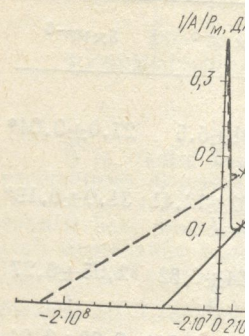


Рис. 1. Построение за

Сплошная линия — мышца
утомления.

Рис. 2. Построение за

Согласно [6], с помощью

пи адренергической
ния избытком I . О
 A/P_m и Q/P_m и
[6]: K_m определяли
($1/Y$; $1/I$) — т. е. в
тах ($1/Y$; I). Соотв

представлены на ри
Различие абсц
ходной кривой, соот
2 — высоким. Экстр
ось $1/I$ позволила о
 $Y_{\max}$ в обеих систе
отсекаемого прямых

Обозначим полу
ке работоспособност
дет $K_{\max}$. Тогда ана
полного утомления
для оценки теплопр
чения констант инги

В результате пр
 $K_{\max} = 0,13 \cdot 10^{-7}$, $K_{\max}$
 $= 3,5 \cdot 10^{-5}$, $K_{\max} =$

ного ингибирования [6]. Такое сопоставление допустимо из-за функционального сходства циторецепторов и активных центров ферментов [6, 11, 12], соответственно, и сходства оккупационной теории Кларка — Ариенса и теории Михаэлиса — Ментен. Отсюда следует и идентичность методов анализа десенситизации и субстратного ингибирования [4, 6].

Опишем полученные зависимости уравнением Михаэлиса — Ментен, учитывающим и явление дисенситизации избытком I :

$$Y = \frac{Y_{\text{макс}} \cdot [I]}{K_M + [I] + \frac{[I]^2}{K}} \quad (1)$$

где Y — величина эффекта (A/P_m , Q/P_m) при данной концентрации I ; K_M — кажущаяся константа Михаэлиса — Ментен полиферментной це-

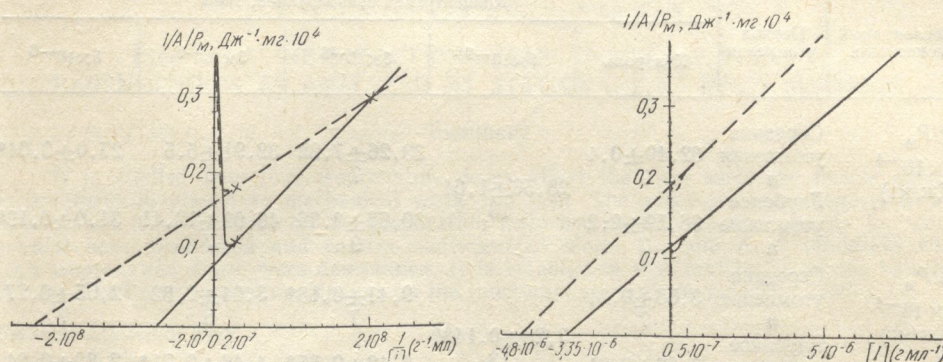


Рис. 1. Построение зависимости удельной работоспособности (A/P_m) от дозы изопреналина в координатах ($1/A/P_m$; $1/I$).

Сплошная линия — мышца, работавшая до начала развития контрактуры, пунктир — до полного утомления. С помощью данного построения определяли K_M и $A/P_{m \text{ макс}}$.

Рис. 2. Построение зависимости удельной работоспособности (A/P_m) от дозы изопреналина в координатах ($1/A/P_m$; I).

Согласно [6], с помощью данного построения определяли K . Остальные обозначения — см. рис. 1.

пи адренергической регуляции, K — субстратная константа ингибирования избытком I . Определение K_M , $Y_{\text{макс}}$ (т. е. максимальной величины A/P_m и Q/P_m) и K производили методом графической линейаризации [6]: K_M определяли на графике в координатах Лайнуивера — Берка ($1/Y$; $1/I$) — т. е. в двойных обратных координатах, а K — в координатах ($1/Y$; I). Соответствующие графики для зависимости A/P_m от $[I]$ представлены на рис. 1 и 2.

Различие абсцисс позволяет на рис. 1 линейаризовать ветвь исходной кривой, соответствующую низким концентрациям I , а на рис. 2 — высоким. Экстраполяция полученных таким образом прямых на ось $1/I$ позволила определить K_M (рис. 1), а на ось $[I]$ — K (рис. 2). $Y_{\text{макс}}$ в обеих системах координат определяется по величине отрезка, отсекаемого прямым на оси ординат $1/Y$.

Обозначим полученные величины. Пусть K_M , полученная при оценке работоспособности мышцы, работавшей до начала контрактуры, будет $K_{\text{макс}}$. Тогда аналогичный показатель для мышцы, работавших до полного утомления будет $K_{\text{мап}}$. Соответственно обозначены константы для оценки теплопродукции $K_{\text{мдк}}$ и $K_{\text{мдп}}$. Аналогичен принцип обозначения констант ингибирования.

В результате проведенной графической линейаризации установлено: $K_{\text{макс}} = 0,13 \cdot 10^{-7}$, $K_{\text{мап}} = 0,43 \cdot 10^{-8}$, $K_{\text{ак}} = 2,3 \cdot 10^{-6}$, $K_{\text{ап}} = 5,0 \cdot 10^{-6}$, $K_{\text{мдк}} = 3,5 \cdot 10^{-5}$, $K_{\text{мдп}} = 4,8 \cdot 10^{-6}$, $K_{\text{д.к}} = 4,5 \cdot 10^{-3}$, $K_{\text{дп}} = 8,5 \cdot 10^{-6}$ (г/мл);

$A/P_{\text{м макс}} = 11,11 \cdot 10^{-4}$ Дж/мг, $A/P_{\text{м макс п}} = 5,88 \cdot 10^{-4}$ Дж/мг; $Q/P_{\text{м макс}} = 34,2 \cdot 10^{-4}$ Дж/мг, $Q/P_{\text{м макс п}} = 50,0 \cdot 10^{-4}$ Дж/мг.

Особенности проведения калориметрических опытов не позволяли вводить I в перфузат в процессе эксперимента, т.е. при различных функциональных состояниях мышцы. Исходя из этого различие констант, полученных при различных функциональных состояниях, позволяет определить, как влияет утомление на кинетику использования энергии, запасы которой изменила предварительная экспозиция в растворе I .

Влияние различных концентраций изопrenalина на удельную работоспособность ($A/P_{\text{м}}$) удельную теплопродукцию ($Q/P_{\text{м}}$) и калорический коэффициент работы (Q/A) скелетных мышц

Исследуемый показатель	Период утомления	Концентрация изопrenalина, г/мл				
		Контроль	5×10^{-9}	5×10^{-8}	5×10^{-7}	5×10^{-6}
$Q/P_{\text{м}}$ ($\times 10^{-4}$ Дж/мг)	Середина утомления n	$32,40 \pm 0,4$ 7		$33,26 \pm 7,22$ 7	$32,91 \pm 5,5$ 6	$27,0 \pm 0,04^*$ 7
	Глубокое утомление n	$36,59 \pm 2,2$ 7	$28,56 \pm 1,64$ 13	$30,66 \pm 3,36$ 9	$46,02 \pm 12,41$ 7	$31,0 \pm 0,19^*$ 6
$A/P_{\text{м}}$ ($\times 10^{-4}$ Дж/мг)	Середина утомления n	$3,55 \pm 0,31$ 7		$9,41 \pm 0,18^*$ 7	$3,64 \pm 0,82$ 6	$2,95 \pm 0,27$ 7
	Глубокое утомление n	$2,60 \pm 0,21$ 7	$3,28 \pm 0,143^*$ 13	$5,42 \pm 0,55^*$ 9	$4,46 \pm 0,71^*$ 7	$2,82 \pm 0,24$ 6
Q/A	Середина утомления n	$9,13 \pm 0,05$ 7		$3,53 \pm 0,38^*$ 7	$9,04 \pm 3,66$ 6	$9,15 \pm 0,68$ 7
	Глубокое утомление n	$14,07 \pm 1,22$ 7	$8,71 \pm 0,62^*$ 13	$5,66 \pm 0,77^*$ 9	$10,32 \pm 1,79$ 7	$11,0 \pm 1,06^*$ 6

Примечание. *—отличие данных от контроля статистически достоверно.

Анализ полученных кинетических показателей основан на представлениях кинетики полиферментных систем. Согласно принципу Боденштейна — Семенова, математически обоснованному [10], кинетика таких цепей определяется лимитирующими стадиями. В таком случае определяемая нами кажущаяся $K_{\text{м}}$ равна:

$$K_{\text{м}} = K_{\text{с}} \cdot k_i / k_{i+1}, \quad (2)$$

где $K_{\text{с}}$ — субстратная константа взаимодействия I с адренорецептором; k_i — константа скорости лимитирующей i -ой реакции; k_{i+1} — константа скорости образования комплекса «изопrenalин — адренорецептор».

Это означает, что изменение константы лимитирующей реакции на зарецепторных стадиях проявляется в изменении константы Михаэлиса — Ментен, так что увеличение k_i проявляется в увеличении $K_{\text{м}}$ и наоборот. Форма эксперимента (предварительная экспозиция мышцы в растворе I) исключает возможность толкования изменения $K_{\text{м}}$ как результат изменения $K_{\text{с}}$ и K_{i+1} . Следуя этой логике, можно сделать вывод, что в процессе утомления затрудняется использование энергии как в форме механической работы ($K_{\text{мак}} > K_{\text{мап}}$), так и в форме теплопродукции ($K_{\text{мтк}} > K_{\text{мтп}}$).

Блокирование адренорецепторов высокими дозами сказывается в уменьшении энерготрат как в форме механической работы, так и в

форме теплопродукции (сравните в

Обращает на ингибируется на

ция — в началь

Таким обра

примененных д

цы, можно сдел

пользование эн

катехоламина и

ного состояния

адренергической

N. I.

ISOPRENALINE
EXPENDITURE

It is studied how
expenditures display
re analyzed from the
specific heat product
high isoprenaline dose
lamine effect of isop

Medical Institute, Kiev

1. Абрамцев И. И., концентрация — эффект. Бюл. эксперим. биол.
2. Козлов А. Г. Об укр. биохим. журн.
3. Козлов А. Г., Ка. мышцы лягушки.
4. Комиссаров И. В. Медицина, 1969. 2
5. Комиссаров И. В. ческих мембран.
6. Курский М. Д., К. Вища школа, 1977
7. Путилин Н. И. Те деятельности и от ва: Тез. докл. Л., 1
8. Пшеничкова М. Г. системы на сердце с. 73—75.
9. Самойлович И. М. Фармакология и то
10. Тихонов А. Н. Ст метры при произво
11. Ariens E. J., Beld 1977, 26, N 10, p. 9
12. Barlow R. B. How receptors. — Pharma
13. Lineweaver H., Bu J. Amer. Chem. Soc.
14. Watanabe M., Ohn preparation to beta of catecholamines.

Киевский
медицинский институт

форме теплопродукции. При этом теплопродукция ингибируется сильнее (сравните величины $K_{ак}$, $K_{ап}$, $K_{кк}$, $K_{кп}$).

Обращает на себя внимание также и тот факт, что работа сильнее ингибируется на стадии полного утомления ($K_{ак} < K_{ап}$), а теплопродукция — в начальной стадии работы мышцы ($K_{кк} > K_{кп}$).

Таким образом, исходя из представлений стационарной кинетики, примененных для анализа влияния на энерготраты работающей мышцы, можно сделать вывод: утомление скелетной мышцы затрудняет использование энергетического потенциала, увеличенного при действии катехоламина изопrenalина. Иными словами, изменение функционального состояния мышцы в ходе ее длительной работы изменяет кинетику адренергической регуляции энергообмена.

N. I. Putilin, A. G. Kozlov, Yu. Yu. Menshikh,
V. I. Zaviyalov, G. S. Pekach

ISOPRENALINE EFFECT ON SKELETAL MUSCLE ENERGY EXPENDITURES AS ANALYZED BY STATIONARY KINETICS METHODS

Summary

It is studied how four isoprenaline doses affect the frog sartorius muscle energy expenditures displayed as mechanical work and heat. The «dose-effect» dependences were analyzed from the data on the preparation influence on the specific capacity for work, specific heat production and caloric coefficient of work. K_m and K of inhibition with high isoprenaline doses were determined. It is established that realization of the catecholamine effect of isoprenaline depends on the functional state of the muscle.

Medical Institute, Kiev

Список литературы

1. Абрамец И. И., Комиссаров И. В., Реуцкая Г. И. Форма и наклон кривых «концентрация—эффект» катехоламинов в опытах на гладкомышечных препаратах.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1971, 71, № 2, с. 48—51.
2. Козлов А. Г. Обмін макроергів і теплоутворення за умов м'язового стомлення.— Укр. біохім. журн., 1973, 45, № 4, с. 393—397.
3. Козлов А. Г., Казьмин С. Г. Влияние изопrenalина на энерготраты изолированной мышцы лягушки при утомлении.— Физиол. журн., 1978, 24, № 4, с. 562—567.
4. Комиссаров И. В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. М.: Медицина, 1969. 216 с.
5. Комиссаров И. В. Принцип кооперативности в рецепторной функции цитоплазматических мембран.— Фармакология и токсикология, 1977, 40, № 6, с. 715—722.
6. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика. Киев: Вища школа, 1977. 264 с.
7. Путилин Н. И. Термодинамика и работоспособность скелетных мышц в процессе их деятельности и отдыха.— В кн.: XII съезд Всесоюз. физиол. о-ва им. И. П. Павлова: Тез. докл. Л., 1975, с. 142.
8. Пшенникова М. Г. Внутриклеточная мишень инотропного действия адренергической системы на сердечную мышцу.— Патол. физиология и эксперим. терапия, 1979, № 4, с. 73—75.
9. Самойлович И. М. Десенситизация и механизм ее развития. (Обзор литературы).— Фармакология и токсикология, 1971, 34, № 6, с. 736—742.
10. Тихонов А. Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных.— Мат. сб., 1952, 31 (73), № 3, с. 575—586.
11. Ariens E. J., Beld A. J. The receptor concept in evolution.— Biochem. Pharmacol., 1977, 26, N 10, p. 913—918.
12. Barlow R. B. How drugs work? Chemical nature of interactions between drugs and receptors.— Pharmacol. J., 1976, 217, N 5889, p. 306—308.
13. Lineweaver H., Burk D. The determination of enzyme dissociation of constants.— J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, N 3, p. 658—666.
14. Watanabe M., Ohne Y., Kasuya Y. Desensitization of guinea pig tracheal muscle preparation to beta-adrenergic stimulants by a preceding exposure to a high dose of catecholamines.— Jap., J. Pharmacol., 1976, 56, N 1, p. 43—47.

Киевский
медицинский институт

Поступила в редакцию
20.III 1980 г.