

and depression of anticoagulant and fibrinolytic activities was observed after injection of 1.7 CTA units/kg of plasmin. α_1 adrenoreceptors were shown to be the terminal efferent link of the compensatory response to plasmin. Nonselective α -adrenoreceptor antagonist dihydroergotoxin (1 mg/kg) and α_1 -adrenoreceptor antagonist prazosin (2 mg/kg) effectively blocked the compensatory response to plasmin and increased fibrinolysis due to liberation of vascular plasminogen activators. The α_2 -adrenoreceptor antagonists yohimbine (5 mg/kg) had no such effects.

M. V. Lomonosov University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the USSR, Moscow

1. Калишевская Т. М., Голубева М. Г. Нервная регуляция жидкого состояния крови и ее свертывания // Успехи физиол. наук.—1982.—13, № 2.—С. 93—122.
2. Калишевская Т. М., Голубева М. Г., Андрианов В. В., Башков Г. В. Роль адренорецепции в осуществлении защитной реакции на плазмин в организме млекопитающих // Патол. физиология и эксперим. терапия.—1986, № 4.—С. 56—61.
3. Калишевская Т. М., Голубева М. Г., Кирзон М. В. Влияние плазмина на эфферентную симпатическую активность у лягушек и крыс // Вестн. МГУ.—1982, № 2.—С. 25—29.
4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. Комплекс адреналин — гапарин как гуморальный агент противосвертывающей системы крови // Вопр. мед. химии.—1971.—17, № 1.—С. 46—53.
5. Методы исследования фибринолитической системы крови.—М.: МГУ, 1981.—132 с.
6. Чазов Е. И., Лакин К. М. Антикоагулянты и фибринолитические средства.—М.: Медицина, 1977.—312 с.
7. Deutsch D. G., Mertz E. T. Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography // Science.—1970.—170, N 8024.—P. 1095—1096.
8. Di Serio F. J., Sasahara A. A. Multicenter Trial Committee United States of Dihydroergotamine and Heparin Prophylaxis of Deep Vein Thrombosis. // Amer. J. Surgery.—1985.—24, N 1.—P. 25—32.
9. Kalishevskaya T. M., Golubeva M. G., Bashkov G. V. Use of an α -adrenoceptor antagonist dihydroergotoxin in experimental anticoagulant and fibrinolytic therapy // V-th International Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrhagic Diseases. May 20—22, 1987.—Erfurt, 1987.—P. 74 (abstr.)
10. Kudryashov B. A., Kalishevskaya T. M. Existence and significance of a reflex humoral antiplasmin system in the organism // Nature.—1963.—198, N 2571.—P. 763—765.
11. Nakajima K. A possible mechanism of vasoactive agents on plasminogen activator release in isolated perfused pig ears // Thromb. Res.—1983.—29, N 2.—P. 187—196.

Моск. ун-т им. М. В. Ломоносова
М-ва высш. и сред. спец. образования СССР

Поступила 16.10.87

УДК 615.217.22:616.127:612.014+612.014.4

Адренергические лиганд-рецепторные взаимодействия — важное звено механизма ишемического повреждения миокарда

Л. Т. Малая, Л. К. Бахова, Г. Е. Загоруйко, В. А. Коптелов

В последние 10 лет установлена роль нарушения адренореактивности, систем транспорта Ca^{2+} , активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в повреждении миокарда [1, 2, 8, 9, 14, 15, 19]. В этой связи чрезвычайно актуальным, но мало изученным вопросом является значение структуры адренорецепторных взаимоотношений в работе аденيلاتциклазной системы (АЦС) — многокомпонентного белкового комплекса, связанного с трансмембранной передачей сигнала в клетку и регуляцией структурно-функционального состояния клеточных мембран.

Цель настоящего исследования — выявить особенности лиганд-рецепторных взаимодействий в адренергическом влиянии (медиации) на кардиомиоциты (КМЦ) и эритроциты (ЭР) и их роли в изменении структурных и функциональных характеристик клетки в развитии ишемического повреждения сердечной мышцы.

Методика

Экспериментальную ишемию миокарда у белых крыс воспроизводили по методу, описанному ранее [18]. Опыты проведены на 170 крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г, разделенных на две группы: I — контрольные животные, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, II — крысы, которым вводили адреналин (300 мкг/100 г). Затем одновременно через 15—16 ч от начала воздействия или в динамике развивающихся изменений исследовали содержание катехоламинов (адреналин — А, норадреналин — НА) и диоксифенилаланина (ДОФА) [13] в тканях (гипоталамусе, надпочечниках, крови, миокарде); ферментативную активность моноаминоксидазы — МАО (субстрат тирамин) в митохондриях [16] и содержание малонового диальдегида (МДА) в микросомальной фракции сердца [3]; активность обратного нейронального мембранного транспорта ^3H -НА в предсердиях [11]. С этой целью использовали радиоизотопный препарат DL-7 ^3H -НА фирмы «Amersham» (Англия) удельной радиоактивностью 34 Ки/ммоль, который добавляли в пробу слайсов ткани в концентрации 0,1 ммоль/л. В качестве специфического ингибитора нейронального транспорта использовали мелипрамин в концентрации 10^{-5} моль/л. Для оценки радиоактивности исследуемой ткани использовали жидкостно-сцинтилляционный счетчик фирмы «LS Beckman 7800» (Австрия). В ЭР и плазме крови животных определяли А, НА, ДОФА [12], содержание гидроперекисей [17], уровень хемилюминесценции, инициированной Fe^{2+} и аскорбатом [5], перекисную резистентность ЭР [4], активность собственной ультрафиолетовой флуоресценции белков в ЭР [6]. Для выяснения роли изучаемых процессов в повреждении клетки исследовали изменение адренергических влияний и активность перекисного окисления липидов при модулирующем действии *in vitro* А (10^{-5} моль/л — доза соответствует применяемой *in vivo*), простагландина E_2 — ПГЕ $_2$ (10^{-8} моль/л) и А; адrenoблокаторов (пропранолола, дигидроэрготамина — 10^{-4} моль/л) и А; Ca^{2+} (27,5 ммоль/л) и А; блокаторов Ca^{2+} -транспорта (верапамила, дроперидола — 10^{-4} моль/л) Ca^{2+} и А. Добавки вносили в суспензию отмытых в физиологическом растворе ЭР и изучаемые показатели определяли после 30-минутной инкубации при температуре 37 °С. С помощью электронной микроскопии исследовали морфологию ишемизированного миокарда и ЭР. Полученную цифровую информацию обрабатывали методами вариационной статистики и графико-аналитическим методом [7].

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что экзогенный А осуществляет запуск генерализованной системной реакции активации симпатoadреналовых влияний через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему (ГГНС) [10]. В миокарде крыс (II группа через 16 ч от начала воздействия) увеличено содержание А (от $0,35 \pm 0,01$ до $0,48 \text{ мкг/г} \pm 0,02 \text{ мкг/г}$, $P < 0,01$), и НА (от $0,29 \pm 0,02$ до $0,37 \text{ мкг/г} \pm 0,02 \text{ мкг/г}$, $P < 0,05$), снижается коэффициент медиаторно-гормонального действия от 0,9 до 0,7 (НА/А), происходит ингибирование нейронального мембранного транспорта ^3H -НА в левом предсердии крыс (от 2876 ± 124 до $2123 \text{ имп/мин} \pm 108 \text{ имп/мин}$ на 1 г влажной ткани, $P < 0,05$) и ферментативной активности МАО (от $0,28 \pm 0,05$ до $0,15 \text{ мкг NH}_3/\text{мг белка} \pm 0,02 \text{ мкг NH}_3/\text{мг белка}$, $P < 0,05$). При этом в сердце крыс активировалось ПОЛ: содержание МДА в микросомальной фракции миокарда возрастало от $22,3 \pm 1,2$ до $29,4 \text{ нмоль/мг белка} \pm 2,0 \text{ нмоль/мг белка}$ ($P < 0,01$).

Согласно результатам электронной микроскопии, в условиях экспериментального воздействия в миокарде левого желудочка наблюдаются отек стромального компонента и, как следствие, увеличение его объемной доли от 16 до 27 %. В микроциркуляторном русле миокарда появляются отечные эндотелиоциты. В мышечном компоненте выявляются три вида КМЦ: темные, без видимых признаков повреждения (рис. 1, а), дистрофически измененные клетки и КМЦ с признаками миоцитолиза. В темных КМЦ заметно уменьшается объемная доля гиалоплазмы — от 10 до 7 %, что свидетельствует об умеренной дегидратации клеток; митохондрии в миоцитах округлой формы с элек-

тронно-плотным матриксом; миофибриллы находятся в состоянии сокращения; наблюдается выпячивание ядер КМЦ в интерстициальное пространство. Большую часть клеточной популяции составляют дистрофически измененные КМЦ (рис. 1, б). В цитоплазме этих миоцитов выявляются миофибриллы с признаками повреждения по типу гиперконтрактуры; в популяции митохондрий встречаются умеренно набух-

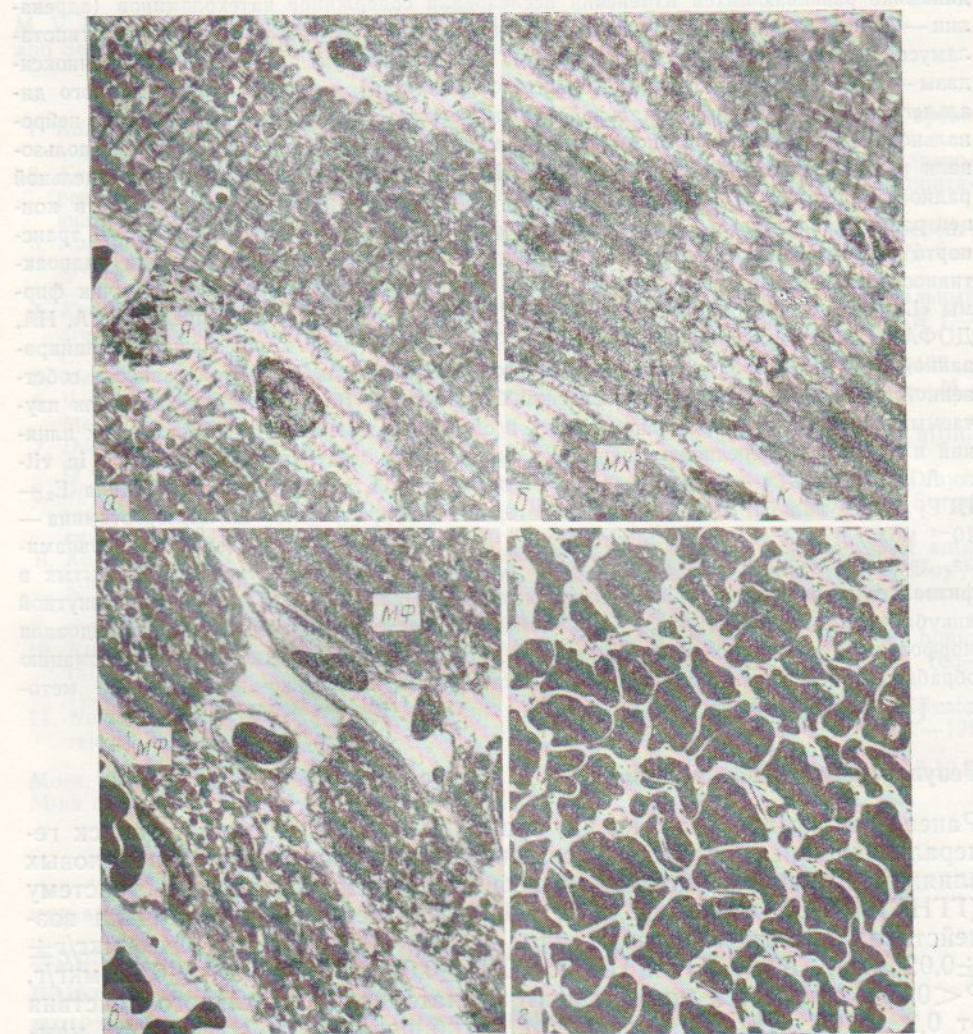


Рис. 1. Морфологические изменения миокарда и эритроцитов (ЭР) крыс при экспериментальной ишемии миокарда:

а — «темные кардиомиоциты (КМЦ)» без видимых признаков повреждения; б — дистрофически измененные КМЦ с признаками повреждения миофибрилл (гиперконтрактура саркомеров); в — КМЦ с признаками миоцитолита; я — ядро, к — капилляр, МХ — митохондрии, МФ — миофибриллы; г — многочисленные ЭР угловатой неправильной формы.

шие и изредка вакуолизированные органеллы. КМЦ с признаками миоцитолита (рис. 1, в) представлены клетками с миофибриллолизом, отеком, пикнозом ядер и лизисом плазматической мембраны на значительном ее протяжении.

Из приведенных биохимических и морфологических данных следует, что повреждение миокарда в ранние сроки после введения А (16 ч) происходит с выраженными признаками ишемии миокарда: чрезмерным моноаминергическим обеспечением миокарда с преобладанием гормональных влияний; ингибированием обратного нейронального мембранного транспорта НА; ингибированием МАО, обусловлен-

ным, по-видимому, трансформацией фермента в результате активации ПОЛ в мембранах КМЦ [2]; наличием кальциевой перегрузки КМЦ, о чем свидетельствуют и морфологические данные — гиперконтрактура миофибрилл, набухание митохондрий, нарушение трофики мышечного и отек стромального компонентов миокарда.

В плазме крови и в связанном, по-видимому, рецепторно с ЭР состоянии происходит значительное увеличение содержания А ($4,6 \pm 0,8$ и $7,1$ нмоль/л $\pm 1,8$ нмоль/л, $P < 0,05$) и ДОФА ($17,1 \pm 3,3$ и $27,2$ нмоль/л $\pm 2,0$ нмоль/л, $P < 0,01$). Исследование ПОЛ в динамике развития повреждения миокарда показывает, что содержание гидроперекисей в ЭР резко увеличивается через 3 ч от начала воздействия, по сравнению с исходным состоянием (кровь для исследования брали у крыс из хвостовой вены), без изменений плазмы. Перекисная резистентность ЭР при этом снижается, а гемолиз растет. Через 16 ч содержание гидроперекисей в ЭР снижается, а в плазме — значительно увеличивается. Уровень хемилюминесценции изменяется аналогичным образом [10]. Как показали исследования собственной ультрафиолетовой флуоресценции ЭР, такие изменения сопровождаются конформационным переходом в белках мембраны. Так через 3 ч от начала воздействия А, по сравнению с исходным состоянием, регистрируется достоверный длинноволновой сдвиг спектра как тирозиновой ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм), так и триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм). Через 16 ч параметры спектров возвращались к исходному состоянию. Обнаружены изменения и морфологии ЭР. Так, заметно увеличивается число эхиноцитов, сфероцитов и ЭР неправильной, угловатой формы (рис. 1, з).

Таким образом, в ЭР, как и в КМЦ, изменяется соотношение А и НА. В адренергическом влиянии на клетку повышается роль А. Можно предположить, что обнаруженные нами изменения рецепторного захвата А ЭР входят в единую систему генерализированной реакции активации САС и имеют важное значение для развития ишемического повреждения миокарда. Активация ПОЛ в ЭР, усиление обменяемости липидами между ЭР и плазмой и, наконец, нарушение формы ЭР могут быть важным звеном в патогенетической цепи повреждения миокарда, поскольку в этих условиях должна изменяться основная функция красных клеток крови — перенос кислорода.

В связи с установленным нами фактом закономерно возникающих изменений характера адренергических влияний в КМЦ и ЭР при необратимых нарушениях структуры и функции миокарда представлялось важным установить роль лиганд-рецепторных взаимодействий в механизме клеточного повреждения. Так как в КМЦ и ЭР особенности моноаминергического обеспечения клетки в целом оказались сходными, заманчиво было исследовать эти взаимодействия на легко доступном, не требующем сложных условий для сохранения функциональной активности, клеточном материале — ЭР. Оказалось, что А (10^{-5} моль/л) вызывает значительное увеличение рецепторного захвата гормона ЭР (рис. 2), не изменяя рецепции НА. Предварительное введение ПГЕ₂ несколько снижало рецепцию А ЭР. Содержание гидроперекисей в мембране ЭР повышалось незначительно, однако перекисный гемолиз ЭР возрастал в 2 раза. Применение бета-адреноблокатора (пропранолола) резко снижало связывание добавленного затем А, не изменяя рецепции НА, содержание гидроперекисей при этом повышалось, а устойчивость к перекисям практически не отличалась от исходной. Следовательно, в условиях бета-блокады в моноаминергическом обеспечении ЭР преобладает НА и такой характер адренергических влияний способствует повышению устойчивости ЭР. Альфа-адреноблокада приводила к активному захвату А клеткой, рецепция НА снижалась в 3 раза и при этом содержание гидроперекисей в ЭР уменьшалось, гемолиз же резко возрастал (60 %). Следовательно, условия альфа-блокады неблагоприятны для стабильности клетки, и ее повреждение связано с повышением роли А в адренергическом обеспечении

клетки. Влияние Ca^{2+} выразилось в повышении рецепторного захвата А лишь в 2,5 раза по сравнению с контролем, НА же не обнаруживался в ЭР, уровень гидроперекисей липидов был низким и отмечалось лишь незначительное снижение устойчивости ЭР к перекисям. Верапамил (10^{-4} моль/л) снижал захват НА и значительно повышал рецепцию А. Роль А в адренергическом влиянии на клетку резко возрастала и это приводило к значительному повреждению ЭР. Дроперидол (10^{-4} моль/л) также влиял на захват А клеткой, снижая его, по сравнению с действием верапамила, что при отсутствии связывания ЭР НА повышало устойчивость ЭР к перекисям.

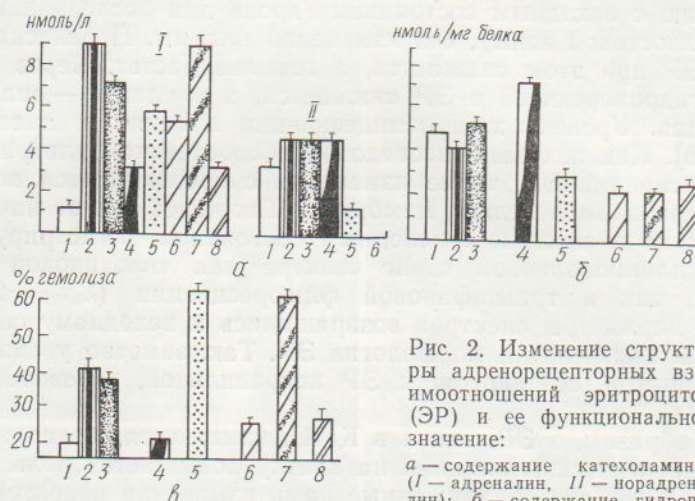


Рис. 2. Изменение структуры адренорецепторных взаимоотношений эритроцитов (ЭР) и ее функциональное значение:

а — содержание катехоламинов (I — адреналин, II — норадреналин); б — содержание гидроперекисей липидов, в — перекисная резистентность ЭР; 1 — контроль; 2 — адреналин (10^{-8} моль/л); 3 — простагландин E_2 (10^{-8} моль/л) и адреналин; 4 — пропранолол (10^{-4} моль/л) и адреналин; 5 — дигидроэрготамин (10^{-4} моль/л) и адреналин; 6 — Ca^{2+} и адреналин; 7 — верапамил (10^{-4} моль/л), Ca^{2+} и адреналин; 8 — дроперидол (10^{-4} моль/л), Ca^{2+} и адреналин.

Таким образом, одним из важных звеньев в механизме ишемического повреждения миокарда является изменение структуры адренорецепторных взаимодействий, которые приводят к повышению роли А в моноаминергическом обеспечении миокарда и, как следствие, перегрузке клеток (КМЦ и ЭР) Ca^{2+} , развитию в них перекисного синдрома повреждения. Установлено, что в КМЦ и в ЭР между адренорецепторами наблюдается тесное функциональное взаимодействие, которое модулирует работу аденилатциклазного комплекса в этих клетках. Проведенные исследования позволяют заключить, что существует, по-видимому, единый универсальный механизм повреждения клетки, который в условиях эксперимента реализует себя в ЭР и КМЦ и может быть воспроизведен *in vitro*. Полученные на ЭР результаты биохимических и морфологических исследований могут быть использованы для понимания повреждения клетки.

ADRENERGIC LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS AS AN IMPORTANT LINK IN THE MECHANISM OF ISCHEMIC MYOCARDIUM DAMAGE

L. T. Malaya, L. K. Bakhova, G. E. Zagoruiko, V. A. Koptelov

Synchronization and close correlation of biochemical, biophysical and morpho-functional changes in cardiomyocytes and erythrocytes were observed in the experiment on 170 male rats with experimental myocardial ischemia. Adrenergic mediation structure is stated to depend on the conditions of the ligand-receptor interaction which modulates the adenylate

cyclase activity. The results are obtained which permit suggesting some molecular mechanisms connected with development of cellular myocardium damage.

Institute of Therapy, Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Kharkov;
Institute of Problems on Cryobiology and Cryomedicine,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

1. *Архипенко Ю. В.* Исследование механизмов модифицирующего действия молекулярного кислорода на систему транспорта Ca^{2+} в мембранах саркоплазматического ретикула: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.— М., 1977.—27 с.
2. *Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. М.* Модификация липидов наружной мембраны митохондрий печени мышей и кинетических параметров мембранно-связанной моноаминоксидазы.— *Вопр. мед. химии.*— 1984.—30, № 1.— С. 66—72.
3. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.—387 с.
4. *Воскресенский О. Н.* Липиды в организме животных и человека.— М.: Наука, 1974.—136 с.
5. *Гонский Я. И.* Метод определения спонтанной и инициированной хемилюминесценции в биологических тканях // *Биохемилюминесценция.*— М.: Наука, 1983.— С. 164—168.
6. *Грек А. М.* Изучение некоторых биофизических механизмов действия низких температур и криопротекторов на эритроциты: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.— М., 1979.—27 с.
7. *Загоруйко Г. Е.* Изменения структурной организации кардиомиоцитов в различных фазах постнатального цитогенеза // *Тез. докл. обл. науч.-практ. конф.*— Харьков, 1986.— С. 3—6.
8. *Ланкин В. З., Закирова А. Н., Ахметова Б. Х.* Перекиси липидов и атеросклероз, свободно-радикальное перекисное окисление полиеновых липидов в крови больных ишемической болезнью сердца // *Кардиология.*— 1980.—20, № 7.— С. 96—99.
9. *Нарушявичус Э. В.* Кальциевый канал и сердце // *Кальций в сердечно-сосудистой системе.*— Каунас, 1982.— С. 3—12.
10. *Малая Л. Г., Лазарева С. А., Бахова Л. К., Загоруйко Г. Е.* Коррекция клеточного повреждения введением ПГЕ₂ в условиях кальциевой перегрузки кардиомиоцитов // *Эпидемиология, профилактика и лечение сердечно-сосудистой системы.*— Харьков, 1984.— С. 43—50.
11. *Манухин Б. Н., Волина Е. В.* Радионуклидное определение захвата норадреналина-Н³ в тканях // *Физиол. журн. СССР.*— 1975.—11, № 5.— С. 785—787.
12. *Матлина Э. Ш.* Флюориметрический метод определения адреналина, норадреналина в периферической крови адсорбцией на окиси алюминия и окислением ферроцианидом // В. В. Меньшиков. Методы клинич. биохимии гормонов и медиаторов: Уч. пособие.— М.: I Моск. мед. ин-т, 1969.—160 с.
13. *Матлина Э. Ш., Рахманова Т. Б.* Метод определения адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в тканях // *Физиология биогенных аминов.*— М.: Наука, 1969.— С. 32—35.
14. *Меерсон Ф. З.* Адаптация, стресс и профилактика.— М.: Наука, 1981.— С. 277.
15. *Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Козлов Ю. П.* Роль перекисного окисления липидов в патогенезе ишемического повреждения и антиоксидантной защиты сердца // *Кардиология.*— 1982.—22, № 2.— С. 81—93.
16. *Северина И. С.* О механизме торможения хлоргиллином и депренилом окислительного дезаминирования тирамина митохондриальной моноаминоксидазой печени крысы // *Биохимия.*— 1980.—45, № 10.— С. 1897—1908.
17. *Asakawa T., Matsushita S.* Coloring conditions of Thiobarbituric acid Test for Detecting Lipid Hydroperoxides // *Lipids.*— 1980.—15.— P. 137—140.
18. *Fleckenstein A., Rona G.* Ricing advances on cardiac extraction and metabolism.— New York: Pergamon press, 1973.— Vol. 6.— P. 158—171.
19. *Nelson M. J., Lefkowitz R. J., Huestis W. H.* Evidence that calcium acts as an intracellular messenger for adrenergic responses in human erythrocytes // *Biochem. et biophys. acta.*— 1980.—600, N 2.— P. 398—405.

Харьков, ин-т терапии
М-ва здравоохранения УССР;
Ин-т пробл. криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Поступила 30.06.87