

IDENTIFICATION AND PROPERTIES OF CHLORIDE CHANNELS OF THE PLASMA MEMBRANE IN THE SECRETORY CELLS

Outward current of the salivary gland cells membrane of chironomus larva activated by the displacement of the membrane potential to the region of positive values has been registered by the voltage-clamp method under conditions of intracellular dialysis in the presence of the chloride transmembrane gradient. Activation threshold of the current is about +20 mV. Subsequent displacement of the membrane potential to the region of positive values causes an increase of the current. Time constant of the current activation is (573 ± 34.4) ms. The current decreases with the reduction of extracellular chloride concentration, under the influence of tannin acid and temperature lowering, under conditions of alkaline medium. The current increases due to Hg^{2+} ions and lowering of the outward solution pH. Thus, the membrane of secretory cells contain high-threshold potential-dependent chloride channels which are characterized by the following selectivity series: $Br^- > Cl^- > NO_3^- > SO_4^{2-} > F^- > HCOO^- > CH_3COO^-$.

I. Franko University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Lvov

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клевев М. Ю. Выявление потенциалозависимых калиевых каналов плазматической мембраны секреторных клеток // Физиол. журн.— 1990.— 36, № 4.— С. 102—104.
2. Клевев М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Там же.— 1986.— 32, № 2.— С. 224—227.
3. Крысталь О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.— 7, № 3.— С. 327—329.
4. Ленинджер Б. Биохимия.— М.: Мир, 1974.— 956 с.
5. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.— М.: Наука, 1971.— 413 с.
6. Brown P. D., Elliot A. C., Lau K. R. Indirect evidence for the presence of nonspecific anion channels in rabbit mandibular salivary gland acinar cells // J. Physiol.— 1989.— 414.— P. 415—431.
7. Edelberg R. The action of tanning acid on the erythrocyte membrane // J. Cell. and Comp. Physiol.— 1952.— 40.— P. 529—548.

Львов, ун-т им. И. Франко

М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил
в редакцию 11.08.90

УДК 616—056.43

В. Е. Мелешко, М. Ф. Тимочко, А. Г. Мысаковец, В. И. Вовк

Неспецифические показатели аллергии при оральной сенсibilизации белком куриного яйца

В силу неблагоприятной экологической обстановки участились случаи пищевой аллергии (ПА), что может быть обусловлено нарушением иммунных барьеров, а также гепатобилиарной системы [10]. Иммунологический статус организма играет важную роль в патогенезе ПА. Поскольку этот вопрос изучен недостаточно [2], мы поставили перед собой задачу изучить некоторые показатели иммунологической реактивности при экспериментальной ПА и дать оценку их значимости для разработки диагностических тестов и способов коррекции ПА.

© В. Е. МЕЛЕШКО, М. Ф. ТИМОЧКО, А. Г. МЫСАКОВЕЦ, В. И. ВОВК, 1991

Использована модель пищевой анафилаксии [9], которая изучена на трех видах животных: морских свинках, кроликах, крысах, орально сенсibilизированных белком куриного яйца (БКЯ), обладающим высокими аллергенными свойствами при переходе через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта. За одно кормление морские свинки получали 30 мг белка в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Проведено пять кормлений ежедневно в определенные утренние часы. Разрешающую дозу (30 мг/мл) вводили в вену задней конечности на 19-е сутки после начала сенсibilизации. У крыс при этой же схеме сенсibilизации вызывали обратную пассивную анафилаксию внутривенным введением 0,8 мл кроличьей антисыворотки к БКЯ на 7-е сутки от начала сенсibilизации. Кроликов сенсibilизировали БКЯ (30 мг/мл) трехкратно с трехдневными промежутками между кормлениями. Разрешающую дозу (90 мг/3 мл) вводили в краевую вену уха на 25-е сутки от начала сенсibilизации. Выраженность шоковой реакции у морских свинок и кроликов оценивали по индексу WCD [14] и выражали в условных единицах, а у крыс — по условной четырехкрестовой системе в сравнении с контролем (введение РД несенсibilизированным животным). В сыворотке и тканях для изучения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) использовали ПЭГ-6000 [6]. Титр антител (ТА) определяли реакцией пробирочной кольцепреципитации и выражали в средних единицах титра. Активность щелочной и кислой фосфатаз (ЩФ и КФ соответственно) выявляли методом Бессея в модификации [5] набором химических реактивов фирмы «Lachema» (ЧССР) и выражали в мкмоль 4-нитрофенола в час на грамм ткани или миллилитр сыворотки (мкмоль 4-нитрофенола $\cdot$ ч $^{-1}$ $\cdot$ г $^{-1}$ или мл $^{-1}$). Активность аланин- и аспартат-аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ соответственно) определяли по Инструкции [3] и выражали в мкмоль пировиноградной кислоты в час в 1 г ткани (мкмоль $\cdot$ ч $^{-1}$ $\cdot$ г $^{-1}$). Относительную лизоцимную активность (%) тканей внутренних органов изучали фотометрически [4].

Содержание общего, восстановленного, окисленного глутатиона определяли титрованием [15] и выражали в мкмоль на грамм (мкмоль/г). Содержание церулоплазмينا исследовали по уровню парафенилендиаминовой активности с пересчетом результатов в микрограмм на литр (мкг/л) сыворотки [8]. Показатель насыщенности трансферрина железом (ПНТЖ) выражали в условных единицах [1]. В изолированных методом дифференцированного центрифугирования [13] митохондриях печени кроликов H^+ -АТФазную активность устанавливали потенциометрическим методом [11] и выражали в мкмоль АТФ за минуту на грамм ткани (мкмоль АТФ $\cdot$ мин $^{-1}$ $\cdot$ г $^{-1}$).

Общее морфологическое исследование проводили в препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Сьюдента — Фишера, учитывая достоверность различий при $P \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Опыты поставлены на 37 морских свинках, 26 крысах, 12 кроликах. Аллергическая реакция на оральную сенсibilизацию по выраженности шоковой реакции характеризовалась следующими признаками: индекс шока у морских свинок — 4 ед., у кроликов — 4 ед., у крыс: у двух животных — тяжелая шоковая реакция (+++), у шести — средней тяжести (++) , что свидетельствовало о развитии гиперчувствительности немедленного типа у всех видов животных, однако в разной мере: максимальной — у кроликов и морских свинок, среднетяжелой — у крыс.

Учитывая, что в патогенезе ПА важная роль принадлежит IgE-иммунным комплексам [11], в динамике аллергической реакции определяли

количество ЦИК и ТА. В сыворотке крови морских свинок в период сенсибилизации по сравнению с нормой на 12-е сутки наблюдалось повышение относительного количества ЦИК на 75 %, на 19-е сутки — на 25 %. При шоке относительное количество ЦИК уменьшалось на 28,2 % у морских свинок, на 60,1 % у кроликов и на 28,8 % у крыс. Уровень иммунных комплексов в тканях морских свинок на 19-е сутки сенсибилизации повышался в печени, селезенке и почках на 38, 37, 22 % соответственно.

Титр антител к БКЯ в сыворотке крови кроликов на 6-е сутки сенсибилизации не определялся, на 12-е — составлял 1 : 6, на 25-е — 1 : 32 и при шоке — 1 : 48 (средние значения). В сыворотке крови крыс ТА к кроличьей антисыворотке определялся на 7-е сутки сенсибилизации (1 : 1) и при шоке (1 : 2).

Сопоставление двух иммунологических показателей позволило заключить, что период сенсибилизации характеризуется одновременным повышением количества ЦИК и ТА, а в период шока при дальнейшем повышении ТА — снижением количества сывороточных ЦИК.

В период сенсибилизации в сыворотке и тканях исследовали активность ЩФ как показателя стабилизации мембран. Установлено, что при сенсибилизации активность этого фермента нарастает в тканях печени и селезенки. В ткани селезенки морских свинок контрольной группы активность ЩФ составила $74,00 \pm 23,09$. Повышение активности ЩФ наблюдалось на 19-е сутки ($156,0 \pm 13,15$; $P < 0,05$) по сравнению с 12-ми сутками исследования ($74,43 \pm 25,66$). У крыс на 7-е сутки сенсибилизации активность ЩФ нарастала в ткани селезенки значительно ($252,0 \pm 10,39$; $P < 0,001$, в контрольной группе — $132,0 \pm 10,27$), чем в печени ($153,0 \pm 9,05$; $P < 0,05$, в контрольной группе — $66,0 \pm 8,6$), в сыворотке крови изменений не наблюдалось.

При исследовании активности КФ как показателя дестабилизации мембран в тканях морских свинок на 12-е сутки сенсибилизации не обнаружено ее изменений в печени, тонкой кишке и желудке при снижении значения этого показателя в селезенке и почках ($62,85 \pm 6,8$; $P < 0,05$; $77,1 \pm 9,1$; $P < 0,01$).

Что касается активности ферментов переаминирования АсАТ и АлАТ, участвующих в детоксикации продуктов белкового обмена, то в тканях крыс изменений активности АсАТ не обнаружено, в то время как активность АлАТ нарастала на 7-е сутки сенсибилизации в печени и селезенке ($27,0 \pm 1,3$; $P < 0,001$; $7,3 \pm 0,7$; $P < 0,001$ соответственно) и снижалась в тканях желудка, тонкой кишки и почек ($14,7 \pm 0,7$; $P < 0,001$; $21,0 \pm 0,3$; $P < 0,001$; $9,3 \pm 0,8$; $P < 0,001$ соответственно).

Следовательно, изменения активности ферментов при оральной сенсибилизации животных БКЯ в тканях печени и селезенки носят компенсаторный характер, на что указывают повышение активности ЩФ, не сопровождающееся гиперферментемией, снижение активности КФ в тканях почек и селезенки и перераспределение активности АлАТ с накоплением ее в печени и селезенке — органах, включающихся в формирование неспецифической реактивности при ПА в ранние сроки сенсибилизации.

Развитие шоковой реакции сопровождалось дальнейшим нарастанием активности ЩФ в тканях. Так, у морских свинок в этот период максимальное повышение активности фермента наблюдалось в ткани селезенки ($236,0 \pm 9,8$; $P < 0,001$), а в тканях желудка ($196,0 \pm 18,07$), тонкой кишки ($208,0 \pm 12,09$), почки ($276,0 \pm 13,15$) и печени ($164,0 \pm 28,06$) оно выражено менее значительно ($P < 0,05$). В этот период в тканях желудка, печени, тонкой кишки морских свинок исследовано содержание трех форм глутатиона как показателя функционирования системы антиоксидантной защиты. Установлено повышение общего и восстановленного глутатиона в ткани тонкой кишки ($0,566 \pm 0,015$; $P < 0,05$; $0,472 \pm 0,025$; $P < 0,001$) и печени ($0,53 \pm 0,087$; $P < 0,001$; $40,48 \pm 0,04$; $P < 0,05$). При шоке у кроликов по сравнению с нормой повышались содержание сывороточного церулоплазмينا ($2,39 \pm 0,09$;

$P < 0,01$) — белка системы антиоксидантной защиты, и значение ПНТЖ ($0,30 \pm 0,02$; $P < 0,001$). Нарастала активность ЩФ в сыворотке крови ($86,6 \pm 3,5$; $P < 0,05$) и в то же время повышалась H^+ -АТФазная активность в митохондриях печени, что свидетельствовало о синтетической активности ($4,61 \pm 0,1$; $P < 0,05$).

Лизоцимная активность как показатель неспецифической резистентности организма определялась при шоке у крыс. В тканях и сыворотке крови несенсибилизированных животных при введении разрешающей дозы БКЯ изменений значения этого показателя не наблюдалось. В период шока снижалось содержание лизоцима в тканях: значительно в селезенке (на 44 %) и легких (на 43,2 %), умеренно в почках (на 15 %) при максимальном нарастании в сыворотке — на 62 % по сравнению с нормой, при этом повышение содержания сывороточного лизоцима находилось в обратной связи с уменьшением числа ЦИК.

При гистологическом исследовании обнаружены иммуноморфологические реакции на оральную сенсибилизацию БКЯ у трех видов животных. Морфологическим эквивалентом напряженности иммунного ответа по гуморальному типу явилась гиперплазия белой пульпы селезенки, как периферического органа иммунной системы, с увеличением числа лимфоидных фолликулов в ней, свидетельствующим об активации иммунологических реакций. Нарушение проницаемости мелких сосудов печени с развитием отека вокруг синусоидального пространства сочеталось с гидропической дистрофией гепатоцитов. В почке наблюдались дистрофические изменения секреторных отделов, в желудке и тонкой кишке — отек слизистой оболочки.

В легких морфологическая картина у всех видов животных характеризовалась развитием острого полнокровия мелких сосудов, отеком стромы и эмфиземой. В почке отмечалось малокровие клубочков с одновременным полнокровием мелких сосудов мозгового слоя. Помимо нарушений проницаемости, отмеченных выше, обнаруживались лимфоцитарные инфильтраты в строме легких крыс, возможно, как результат дальнейшего прогрессирования иммунной реакции.

Как показали исследования при шоке, показателями компенсаторной перестройки сенсибилизированного организма служат накопление ЩФ в тканях, повышение общего и восстановленного тканевого глутатиона, сывороточного церулоплазмينا и показателя насыщенности трансферрина железом, что в значительной мере определяется активацией синтетических процессов в печени и на что указывает нарастание H^+ -АТФазной активности ее в митохондриях. В то же время повышение содержания ЩФ в сыворотке и снижение содержания лизоцима в тканях свидетельствуют о нарушениях компенсации. Вышесказанное позволяет рекомендовать изученные показатели для включения в комплекс диагностических тестов при выявлении аллергии пищевого генеза. Сопоставление полученных результатов показывает, что интенсификация энергетического обмена при оральной сенсибилизации БКЯ на высоте шоковой реакции не обеспечивает достаточной компенсации ввиду дестабилизации мембран. Об этом свидетельствуют нарастание содержания ЩФ в сыворотке крови, нарушение проницаемости, дистрофические изменения в тканях печени и легких при повышении количества ЦИК и снижении содержания лизоцима. Для поддержания гомеостаза при этом требуется неспецифическая коррекция на уровне мембран, которая, как показали наши предыдущие исследования [7], может быть достигнута с помощью интала.

V. E. Meleshko, M. F. Timochko, A. G. Mysakovets, V. I. Vovk

INDICES OF NONSPECIFIC REACTIVITY OF THE ORGANISM IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL FOOD ALLERGY

Some indices of nonspecific reactivity: the number of cyclic immunological complexes, titer of antibodies, activity of alkaline and acid phosphatases, alanine aminotransferase, mitochondrial liver H^+ -ATPase, content of glutathione ceruloplasmin transferrin are sta-

ted to change in the model of food anaphylaxis in 37 guinea pigs, 26 rats and 12 rabbits orally sensitized with hen egg protein and they are estimated prior to and after the allergy development.

Medical Institute, Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Lvov

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабенко Г. О. Визначення мікроелементів і металоферментів у клінічних лабораторіях.— Київ: Здоров'я, 1968.— 187 с.
2. Воронцов И. М., Матальгина О. А. Болезни, связанные с пищевой сенсибилизацией у детей.— Л.: Медицина, 1986.— 272 с.
3. Инструкция по определению глютамино-аспаргиновой и глютамино-алатаниновой трансаминаз (аминотрансфераз) в сыворотке крови человека.— Москва, 1972.— 87 с.
4. Каграманова К. А., Ермольева З. В. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима // Антибиотики. 11, № 10.— С. 917—919.
5. Левицкий А. П., Марченко А. И., Рыбак Т. Л. Сравнительная оценка трех методов определения активности фосфатаз слюны человека // Лаб. дело.— 1973.— № 10.— С. 624—625.
6. Мелешко В. Е., Тимошко М. Ф., Мысаковец А. Г., Велозо М. П. Микрометод определения ЦИК в биологических жидкостях // Рад. предл. № 1587.— Львов.— 1987.
7. Мелешко В. М., Тимошко М. Ф., Гордий Л. Д., Мысаковец А. Г. Действие интала на анафилактический шок у кроликов // Иммунология и аллергия.— Киев, 1989.— Вып. 23.— С. 124—125.
8. Сиверина О. Б., Басевич В. В., Басова Р. В. и др. Метод количественного определения церулоплазмينا // Лаб. дело.— 1986.— № 10.— С. 618—621.
9. Шатерников В. А., Марокко И. Н., Пятницкий И. Н. и др. Экспериментальное воспроизведение пищевой анафилаксии // Вопр. питания.— 1982.— № 2.— С. 27—34.
10. Шатерников В. А. Роль пищевых белков в иммунологических и аллергических реакциях // Вест. АМН СССР.— 1986.— № 11.— С. 34—38.
11. Фишов И. Л. Механизм взаимосвязи активности H^+ -АТФазы митохондрий от функционального состояния дыхательной цепи: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Пушкино, 1983.— 17 с.
12. Carini C., Brostoff J. Evidence for circulating IgE complexes in food allergy // Ricer. clin. Lab.— 1987.— 17, N 4.— P. 309—322.
13. Schneider W., Hoogeboom J. Ultracellular distribution of enzymes // J. Biol. Chem.— 1950.— 183, N 1.— P. 123—128.
14. Weigle W., Cocharane C., Dixon F. Anaphylactogenic properties of soluble antigen—antibody in the guinea-pig and rabbit // J. Immunol.— 1960.— 85.— P. 469—477.
15. Woodward G. E., Ery E. D. The determination of blood glytation // J. Biol. Chem.— 1932.— 97.— P. 465—482.

Львов. мед. ин-т
М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил
в редакцию 24.09.90

УДК 612.73.62

В. П. Загороднюк, Е. Я. Баев, М. С. Яременко

Угнетающее влияние жирных кислот на электрическую и сократительную активность гладких мышц

В настоящее время установлена высокая модулирующая активность свободных жирных кислот (ЖК) по отношению к функционированию различных систем организма. В результате биохимических исследований показано, что ЖК могут прямо активировать или угнетать различные транспортные АТФазы [5, 7], стимулировать Na^+ — Ca^{2+} -обмен и пассивную проницаемость различных мембран для Ca^{2+} [6, 9]. Кроме того, одним из свойств ЖК является способность повышать электропроводность липидных мембран, а следовательно, разобщать окислительное фосфорилирование [3]. Увеличение концентрации ЖК

© В. П. ЗАГОРДНЮК, Е. Я. БАЕВ, М. С. ЯРЕМЕНКО, 1991