

що ектонуклеотидазна активність венозних судин значно вища порівняно із цією активністю артеріальних. Стрічки аорти щурів виявляють істотно вищу екто-АТФазну активність, ніж стінки аорт голубів, морських свинок, кролів. Введення кролям холестерину (0,25 г/кг щодоби протягом 2 тиж) викликає збільшення екто-АТФазної активності артерій і вен, у той час як агенти, що відтворюють артеріосклероз Менкеберга (адреналін, вітамін D₂, моноіодацетат), спричиняють істотне зменшення екто-АТФазної активності вивчених судин. Обговорюється можливе значення виявлених змін для патогенезу уражень судинної стінки.

Вступ

Ще 40 років тому Binet і Burstein [2] показали, що вже одноразове проходження екзогенного АТФ через судини легенів спричиняється до повного його гідролізу. Наведений факт отримав пояснення лише після того, як було відкрито каскадну систему ектонуклеотидаз, вмонтованих ззовні в плазматичну мембрану клітин. Ця система складається принаймні із трьох ферментів: АТФази (КФ 3.6.1.15), АДФази (КФ 3.6.1.6) і АМФази (5'-нуклеотидази, КФ 3.1.3.5). Завдяки цим ферментам відбувається гідролітичне розщеплення позаклітинних (а не внутрішньоклітинних!) аденінових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) до аденозину і неорганічного фосфату.

Привертає до себе увагу значна поширеність ектонуклеотидаз в організмі ссавців. Зокрема, ектонуклеотидазні комплекси, виявлені на поверхні таких клітин, як еритроцити, нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити, тканинні базофіли, тромбоцити, гепатоцити, кардіоміоцити, ендотеліальні та гладеньком'язові клітини кровоносних судин [3, 8]. Питання про фізіологічну роль ектонуклеотидазних ферментів взагалі, і в клітинах судинної стінки зокрема, залишається не з'ясованим. Відсутні будь-які відомості про регіонарні і міжвидові відмінності ектонуклеотидаз артеріальних і венозних судин. Донині невідомим є вплив різних патогенних чинників на активність цих ферментів.

Наведені міркування стали визначальними при виконанні власних експериментальних досліджень, зокрема, з ектонуклеотидазної активності ізольованих стрічок артерій і вен у тварин та впливу деяких пошкоджуючих агентів на екто-АТФазну активність кровоносних судин.

Методика

Досліди виконані на ізольованих, позбавлених адвентиції, спіральних стрічках артерій і вен кролів та грудної аорти щурів, голубів і морських свинок. Визначення ектонуклеотидазної активності стрічок здійснювали в умовах їх інкубації протягом 15 хв (при 37 °C) у розчині Кребса, в якому K_2HPO_4 був заміщений еквівалентною кількістю KCl. В залежності від мети дослідів в інкубаційне середовище додавали один із аденінових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) з таким розрахунком, щоб концентрація його у розчині становила 0,02 моль/л. Ектонуклеотидазну активність визначали за приростом концентрації неорганічного фосфату, що вивільнюється у середовище за час інкубації. Вміст неорганічного фосфату у розчині вимірювали за методикою DuBois і Potter [6]. Розрахунок ектонуклеотидазної активності здійснювали як на одиницю маси тканини, так і на одиницю площі поверхні судинних стрічок.

У дослідях на кролях були вивчені такі пошкоджуючі впливи: внутрішньощлункове введення холестерину (0,25 г/кг на добу) у вигляді 10 %-ної емульсії у соняшниковій олії протягом двох тижнів; внутрішньовенне введення адреналіну (50 мкг/кг на добу) у вигляді 0,1 %-ного розчину адреналіну гідрохлориду протягом двох тижнів; внутрішньощлункове введення вітаміну D₂ (100 000 МО/кг на добу) у

вигляді 0,125 %-ного масляного розчину ергокальциферолу протягом 3—4 діб; внутрішньовенне введення моноіодацетату (10 мг/кг на добу) протягом двох тижнів.

Кролів забивали, використовуючи повітряну емболію, дрібних тварин — шляхом декапітації.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою непараметричних методів: парного критерія Вілкоксона (критерія T) і критерія Вілкоксона—Манна—Уїтні (критерія U) [1].

Результати

Результати, представлені в табл. 1, свідчать про те, що ізольовані стрічки артерій і вен кролів виявляють значну ектонуклеотидазну активність. Найбільший приріст неорганічного фосфату визначається при використанні АТФ як субстрату, менші значення цього показника реєструються при використанні АДФ, і нарешті, збільшення вмісту неорганічного фосфату в інкубаційному середовищі є найменшим у досліді з АМФ. Слід відзначити істотні відмінності, що спостерігаються при аналізі інтенсивності гідролізу екзогенних нуклеотидів стрічками артерій і вен. Так, ектонуклеотидазна активність стрічок задньої порожнистої вени у 2—3 рази вища від такого ж показника артеріальних судин при розрахунку на одиницю маси і на 20—200 % — при розрахунку на одиницю площі поверхні. Стрічки ворітної вени виявляють більш високу ектонуклеотидазну активність порівняно із стрічками артерій лише за умови розрахунку показників на одиницю маси тканини. Виявлені відмінності зникають, якщо розрахунок проводити на одиницю площі поверхні.

Порівняльне вивчення екто-АТФазної активності аортальних стрічок деяких видів тварин (табл. 2) дало підстави для висновку, що у щурів інтенсивність гідролізу АТФ тканиною аорти у 5—6 разів (при розрахунку на одиницю маси) і у 2—4 рази (при розрахунку на одиницю площі поверхні) вища, ніж у голубів, морських свинок і кролів. Відмінності між показниками аорт останніх трьох видів тварин були неістотними ($P > 0,05$). Подальші досліді показали, що екто-АТФазна активність кровоносних судин є показником, дуже чутливим до дії різ-

Таблиця 1. Ектонуклеотидазна активність ізольованих стрічок артерій і вен кролів

Кровоносні судини	Розрахунок на одиницю маси, мкмоль $P_1 \cdot (г \cdot год)^{-1}$		
	АТФаза	АДФаза	АМФаза
Грудна аорта	96,2±10,8	43,9±8,8	18,1±3,5
Черевна аорта	87,9±9,0	40,5±5,5	24,8±4,3
Загальна сонна артерія	109,7±12,1	61,1±7,3	31,9±6,2
Легенева артерія	100,2±15,1	52,0±5,8	28,2±4,9
Задня порожниста вена	240,1±25,7	145,2±11,9	81,9±8,2
Ворітна вена	130,4±13,4	85,5±9,4	52,1±7,0
Кровоносні судини	Розрахунок на одиницю площі поверхні, мкмоль $P_1 \cdot (см^2 \cdot год)^{-1}$		
	АТФаза	АДФаза	АМФаза
Грудна аорта	3,09±0,87	1,48±0,32	0,56±0,1
Черевна аорта	2,51±0,27	1,47±0,13	0,83±0,12
Загальна сонна артерія	3,70±0,35	2,34±0,24	1,09±0,21
Легенева артерія	3,32±0,6	2,04±0,19	1,16±0,2
Задня порожниста вена	4,44±0,47	2,85±0,15	1,62±0,14
Ворітна вена	2,31±0,23	1,74±0,25	1,0±0,16

* Кількість тварин складає 6 при вивченні кожного фермента.

Таблиця 2. Екто-АТФазна активність ізольованих стрічок грудної аорти у деяких тварин

Вид тварини	Розрахунок на одиницю маси, мкмоль $P_i \cdot (г \cdot год)^{-1}$	Розрахунок на одиницю площі поверхні, мкмоль $P_i \cdot X \cdot (см^2 \cdot год)^{-1}$
Щури (7)	$550,0 \pm 31,5$	$8,47 \pm 0,43$
Голуби (10)	$122,0 \pm 18,1$	$3,41 \pm 0,53$
Морські свинки (10)	$73,8 \pm 12,5$	$2,18 \pm 0,35$
Кролі (6)	$96,2 \pm 10,8$	$3,09 \pm 0,87$

Примітка. У дужках — кількість тварин.

Таблиця 3. Екто-АТФазна активність * ізольованих стрічок артерій і вен кролів в умовах дії на організм кролів** різних пошкоджуючих агентів

Судина та її пошкоджувач	Розрахунок на одиницю маси, мкмоль $P_i \cdot (г \cdot год)^{-1}$	Розрахунок на одиницю площі поверхні, мкмоль $P_i \cdot (см^2 \cdot год)^{-1}$
Грудна аорта		
Контроль	$96,2 \pm 10,8$	$3,09 \pm 0,87$
Холестерин	$164,0 \pm 10,3$	$5,51 \pm 0,33$
Адреналін	$51,0 \pm 5,1$	$1,70 \pm 0,15$
Вітамін D ₂	$19,0 \pm 3,5$	$0,63 \pm 0,11$
Моноіодацетат	$51,8 \pm 7,0$	$1,72 \pm 0,21$
Черевна аорта		
Контроль	$87,9 \pm 9,0$	$2,51 \pm 0,27$
Холестерин	$147,7 \pm 7,9$	$4,80 \pm 0,28$
Адреналін	$51,1 \pm 5,7$	$1,71 \pm 0,19$
Вітамін D ₂	$23,1 \pm 4,1$	$0,87 \pm 0,15$
Моноіодацетат	$42,8 \pm 6,1$	$1,43 \pm 0,21$
Загальна сонна артерія		
Контроль	$109,7 \pm 12,1$	$3,70 \pm 0,35$
Холестерин	$166,7 \pm 6,4$	$4,96 \pm 0,16$
Адреналін	$76,9 \pm 7,1$	$2,30 \pm 0,26$
Вітамін D ₂	$37,3 \pm 4,6$	$1,12 \pm 0,14$
Моноіодацетат	$66,9 \pm 8,1$	$1,98 \pm 0,22$
Легенева артерія		
Контроль	$100,2 \pm 15,1$	$3,32 \pm 0,6$
Холестерин	$162,2 \pm 6,6$	$5,41 \pm 0,24$
Адреналін	$62,9 \pm 3,7$	$2,11 \pm 0,12$
Вітамін D ₂	$25,0 \pm 4,4$	$0,86 \pm 0,14$
Моноіодацетат	$52,0 \pm 8,2$	$1,79 \pm 0,27$
Задня порожниста вена		
Контроль	$240,1 \pm 25,7$	$4,44 \pm 0,47$
Холестерин	$355,1 \pm 8,1$	$5,54 \pm 0,24$
Адреналін	$173,0 \pm 7,7$	$2,75 \pm 0,17$
Вітамін D ₂	$148,7 \pm 12,7$	$2,37 \pm 0,24$
Моноіодацетат	$168,7 \pm 12,0$	$2,65 \pm 0,2$
Ворітна вена		
Контроль	$130,4 \pm 13,3$	$2,31 \pm 0,23$
Холестерин	$182,8 \pm 4,7$	$2,94 \pm 0,10$
Адреналін	$89,0 \pm 6,5$	$1,45 \pm 0,12$
Вітамін D ₂	$70,0 \pm 7,6$	$1,13 \pm 0,11$
Моноіодацетат	$87,9 \pm 7,3$	$1,44 \pm 0,12$

* Для усіх наведених значень $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** кількість кролів складає 6 при дії кожного пошкоджуючого агента.

них пошкоджуючих агентів (табл. 3). Зокрема, нами виявлено, що пошкоджуючі впливи на організм можуть спричинювати як підвищення екто-АТФазної активності (при введенні холестерину протягом двох тижнів), так і значне зменшення цього показника (при введенні адреналіну, вітаміну D₂, моноіодацетату) за умов досліду.

Обговорення

Наявність ектонуклеотидаз у судинній стінці доведена численними експериментами, об'єктами дослідження в яких були ізольовані ендотеліальні і гладеньком'язові клітини, тканини окремих ділянок судин, штучно перфузовані органи [3—5, 7, 8]. У виконаних нами власних дослідженнях була ще раз продемонстрована здатність артерій і вен здійснювати гідроліз екзогенних нуклеотидів. Разом з тим, нами виявлена певна закономірність, що може бути цікавим з погляду проблеми, в якій розглядаються метаболічні механізми резистентності кровоносних судин до пошкодження. Сутність зазначеної закономірності полягає в тому, що кровоносні судини, яким притаманна висока стійкість до пошкодження, виявляють значно вищу ектонуклеотидазну активність порівняно з уразливими судинами. Наведене положення ґрунтується на отриманих нами фактах про значно вищу ектонуклеотидазну активність резистентних до пошкодження судин — вен, порівняно із чутливими судинами — артеріями, та про більш високу (в декілька разів!) екто-АТФазну активність аортальної стінки щурів (стійких до пошкодження тварин) у порівнянні із схильними до артерioskлерозу тваринами — голубами, морськими свинками і кролями. Сьогодні ще важко сказати, про що йдеться: про існуючу об'єктивну залежність, чи про випадковий, непов'язаний певними причинно-наслідковими зв'язками, збіг.

Привертає до себе увагу той факт, що агенти, які звичайно відтворюють різні форми уражень судин (атеросклероз, артерioskлероз менкебергівського типу), викликають у порівнянні строки різнонаправлені зміни екто-АТФазної активності артерій і вен. Так, двотижневе введення холестерину, з яким пов'язаний розвиток інфільтративно-проліферативних змін в артеріальній стінці, супроводжується збільшенням екто-АТФазної активності судин. У той же час агенти (адреналін, вітамін D₂, моноіодацетат), які відтворюють дистрофічно-склеротичні зміни, властиві артерioskлерозу Менкеберга, викликають істотне зменшення екто-АТФазної активності досліджених судин. Нині важко сказати, яке значення можуть мати виявлені зміни для патогенезу зазначених форм уражень судин. Аналіз ускладнюється тим, що, крім загальних міркувань, на сьогодні відсутні будь-які докази фізіологічної ролі існуючої системи ектонуклеотидазних ферментів, не кажучи вже про її роль за патологічних умов.

Є підстави стверджувати, що ймовірними джерелами позаклітинних аденіннуклеотидів — субстратів ектонуклеотидаз, можуть бути ушкоджені клітини, тромбоцити і пуринергічні нервові закінчення. З урахуванням цього привабливим є припущення про те, що ектонуклеотидази можуть бути причетними до здійснення принаймні трьох процесів: регуляції судинного тону (через утворення аденозину — природного сильнодіючого вазодилататора), регуляції судинно-тромбоцитарного гемостазу (через вплив на концентрацію АДФ, а отже, і на агрегацію тромбоцитів), і нарешті, регуляції пуринергічних нервових впливів на гладеньком'язові структури судин. Якщо погодитися з наведеними вище міркуваннями, то істотне зменшення ектонуклеотидазної активності, яке ми спостерігаємо в судинах за умов моделювання ранніх ознак артерioskлерозу Менкеберга, слід розглядати як одну з можливих причин частого спазмування уражених артерій і посиленого тромбоутворення в них. Збільшення ектонуклеотидазної активності судин у ранній доліпідній фазі експериментального атеросклерозу може бути одним з ланцюгів механізму запобігання розвитку зазначених вище небажаних ускладнень.

O. V. Ataman

ECTONUCLEOTIDASE ACTIVITY OF ISOLATED STRIPS OF ARTERIES AND VEINS OF EXPERIMENTAL ANIMALS. INFLUENCE OF SOME DAMAGING AGENTS ON ECTO-ATPase ACTIVITY OF BLOOD VESSELS

It is shown that ectonucleotidase activity of the venous vessels of rabbits is significantly higher than that of the arteries. The aorta of rats exhibits a higher ecto-ATPase activity as compared with the aortas of pigeons, guinea-pigs and rabbits. Administration of cholesterol to rabbits is accompanied by the increase of ecto-ATPase activity of blood vessels, and use of epinephrine, vitamin D₂, monoiodacetate causes a significant decrease of that index.

A. A. Bogomoletz Medical Institute, Ministry of Public Health of the Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1973.— 141 с.
2. Binet L., Burstein M. Poumon et action vasculaire de l'adenosine-triphosphate // *Presse Med.*— 1950.— 58.— P. 1201—1203.
3. Carleton J. S., Gordon J. I., Hutchings A. et al. Secretion and extracellular metabolism of adenine nucleotides by endothelial cells in culture // *J. Physiol. (Gr. Brit.)*— 1979.— 291.— P. 40 p.
4. Crutcheley D. J., Eling T. E., Anderson M. W. ADPase activity of isolated perfused rat lung // *Life Sci.*— 1978.— 22.— P. 1413—1420.
5. Crutcheley D. J., Ryan U. S., Ryan J. W. Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery // *J. Clin. Invest.*— 1980.— 66.— P. 29—35.
6. DuBois K. P., Potter V. R. Assay of animal tissues for respiratory enzymes: adenosine triphosphatase // *J. Biol. Chem.*— 1943.— 150, N 1.— P. 185—195.
7. Gordon E. L. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface // *Ibid.*— 1989.— 264, N 32.— P. 18986—18995.
8. Pearson J. D. Ectonucleotidases. Measurement of activities and use of inhibitors // *Meth. Pharmacol.*— 1985.— 6.— P. 83—107.

Київ. мед. ін-т ім. О. О. Богомольця
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 06.05.91

УДК 612.33+591.132.5:577.121.7

Н. А. Захаренко

Интенсивность клеточного дыхания и редокс-состояние НАМ-коферментов в эпителии тонкой кишки новорожденных в норме и при диарее

Изучали содержание и соотношение метаболитов лактат-, малат- и глутаматдегидрогеназных систем, отношение [НАДФ] к [НАДФ·Н], а также активность некоторых дегидрогеназ, щелочной фосфатазы и γ-глутамилтрансферазы в цитоплазме и митохондриях слизистой оболочки тощей кишки и желудка у здоровых и больных с острыми расстройствами пищеварения новорожденных телят. Показано, что у больных животных изменяется интенсивность окислительно-восстановительных процессов, снижается энергообеспечение тканей, нарушаются гидролитические и транспортные функции тканей желудка и слизистой оболочки тонкой кишки.

© Н. А. ЗАХАРЕНКО, 1991

INSS 0201-8489. Физиол. журн. 1991. Т. 37. № 6.

Введение

Активный транспорт сахаров, аминокислот, ионов в тонкой кишке обеспечивается большой удельной поверхностью слизистой оболочки [7], высокой активностью энергетических процессов в эпителиоцитах [9, 11]. У новорожденных животных скорость гликолитических процессов и интенсивность аэробного дыхания в эпителии тонкой кишки значительно ниже, чем у взрослых [18]. Это обусловлено прежде всего особенностями пищеварения и транспорта биополимеров и метаболитов, что характерно для новорожденных жвачных [10, 18]. Нарушение мембранного пищеварения, которое является доминирующим при переходе жвачных от пре- к постнатальному периоду развития, часто сопровождается рядом функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта, протекающих с диарейным синдромом [8, 10]. При этом у больных животных изменяется структура и функции эпителиоцитов, снижается активность Na^+ , K^+ -АТФазы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), энтерокиназы и щелочной фосфатазы, что свидетельствует о нарушении гидролитических и транспортных процессов [4, 10], развиваются ацидоз крови и дегидратация [3, 10]. Известно, что повышение кислотности крови изменяет всасывание воды и электролитов в петлях тонкой кишки и частично предотвращает у больных животных индуцированную токсинами секрецию [14]. Учитывая изложенное выше, можно ожидать и значительные изменения энергетических процессов в эпителии тонкой кишки при диарее.

Цель исследований — изучить особенности клеточного дыхания и редокс-состояния НАМ-коферментов в эпителии тонкой кишки и желудка новорожденных телят при острых расстройствах пищеварения, сопровождающихся диареей.

Методика

Объектом исследования служили 3—4-суточные новорожденные телята средней живой массой 32—35 кг здоровые и больные (с острыми расстройствами пищеварения). Лечение больных животных не проводили. Диагноз ставили по клиническим показателям, а также по результатам микробиологических и вирусологических исследований содержимого кишечника. Отбор проб тканей сычуга (желудка) и слизистой оболочки тощей кишки осуществляли после 12-часовой голодной диеты и декапитации животных. Предварительно органы освобождали от содержимого многократной промывкой желудка и тощей кишки физраствором, содержащим 0,2 моль/л ЭДТА (рН 7,4). Слизистую оболочку проксимального и дистального участков тощей кишки получали методом соскоба на холоду. Пробы немедленно замораживали в жидком азоте. Затем ткани измельчали, прибавляли 6 %-ный раствор HClO_4 (соотношение 1:7), гомогенизировали, центрифугировали, а полученный супернатант нейтрализовали 49 %-ным раствором КОН, после чего удаляли перхлораты. Все операции проводили на холоду. В полученных экстрактах тканей желудка и слизистой оболочки тощей кишки, используя кристаллические препараты лактатдегидрогеназы из мышц, малатдегидрогеназы из сердца свиньи (фирма «Reanal», Венгрия), глутаматдегидрогеназы из печени крупного рогатого скота (фирма «Fegac», Германия), а также восстановленные и окисленные формы никотинамидных коферментов (НАМ-коферментов, фирма «Serga», США), исследовали содержание лактата и пирувата [17], малата и оксалоацетата [16], α -кетоглутарата и глутамата [12], цитрата [22]. Определяли содержание глюкозы [2] и аммиака [6]. Редокс-состояние свободных НАМ-коферментов рассчитывали по соотношению метаболитов и констант равновесия лактат-, малат- и глутаматдегидрогеназных систем [20].

Митохондрии и цитоплазматическую фракцию эпителиоцитов слизистой оболочки тощей кишки получали по методу Johnson и Lardy