

19. Sloviter R. S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy // Science.—1987.—235, N 8.—P. 73—76.
20. Stoessl A. J. Peptide-dopamine interactions in the central nervous system: implications for neuropsychiatric disorders // J. Psychopharm.—1989.—3, N 2.—P. 99—120.
21. Tortella J. C. Endogenous opioid peptides and epilepsy: queting the seizing brain // Trends. Pharmacol. Sci.—1988.—9, N 10.—P. 366—372.
22. Uhl G. R., Snyder S. H. Regional and subcellular distributions of brain neurotensins // Life Sci.—1976.—19, N 1.—P. 1827—1832.
23. Woodbury D. M. Convulsant drugs: Mechanisms of action // Antiepileptic drugs: Mechanisms of action / Ed. by Glaser G. H., Penry J. K., Woodbury D. M. // New York: Raven press, 1980.—P. 249—303.

Одес. мед. ін-т ім. М. І. Пирогова
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 26.03.93

УДК 612.127—008.9—097.3—085.279.57

Л. І. Алексюк, Р. І. Янчій, Ю. П. Бідзіля, В. С. Сухіна

Вплив антитіл, специфічних до сарколеми кардіоміоцитів щурів, на активність 5'-нуклеотидази

Изучали влияние кроличьих антител, специфических к сарколемме кардиомиоцитов, на активность эктофермента 5'-нуклеотидазы кардиомиоцитов крыс линии Вистар. Показано, что при инкубации изолированных плазматических мембран кардиомиоцитов крыс (100 мкг белка) с гамма-глобулиновой фракцией антисарколеммальной кардиальной сыворотки (γ-АСКС) и с гамма-глобулиновой фракцией нормальной кроличьей сыворотки (γ-НКС) в дозе 20 и 0,20 мкг белка снижается активность фермента. Ингибирующий эффект выражен в большей мере при инкубации с γ-НКС, не зависит от дозы антител и продолжительности их действия. Высказано предположение, что ингибирующее действие антител на активность экто-5'-нуклеотидазы может привести к изменению концентрации аденозина и может быть одним из звеньев механизма увеличения внутриклеточной концентрации кальция.

Вступ

Роботами багатьох дослідників було показано, що антикардіальні антитіла впливають на скоротливу здатність кардіоміоцитів та функції серця у цілому [1, 2, 4, 5, 7]. При вивченні механізмів змін функціонального стану клітин під впливом антитіл вважають за важливе виявлення зрушень у процесах, що відбуваються на плазматичній мембрані (ПМ). Показано, що антикардіальні антитіла впливають на активний транспорт іонів через мембрану, змінюючи активність Na^+ , K^+ -АТФази [2, 4]. Одним із механізмів, що ініціюють дію антитіл на клітини, може бути також взаємодія антитіл з мембранным ферментом 5'-нуклеотидазою. Цей фермент має активні центри, що обернені назовні клітин і доступні позаклітинним субстратам [10, 12]. У результаті участі 5'-нуклеотидази у гідролізі АМФ та інших пуринмонофосфатів здійснюється регуляція вмісту аденозину в клітині [3, 8]. Крім того, 5'-нуклеотидаза являє собою рецепторний білок, має пов'язуючу активність [9], що визначає її важливу роль у міжклітинних взаємодіях. Все це визначило мету нашого дослідження: вивчення змін активності 5'-нуклеотидази у ПМ кардіоміоцитів щурів під впливом специфічних до цих мембран антитіл.

© Л. І. АЛЕКСЮК, Р. І. ЯНЧИЙ, Ю. П. БІДЗИЛЯ, В. С. СУХІНА, 1993

Методика

Досліди проведені на шула до сарколеми кардіоміоцитів (γ-АСКС). Сироватку с ПМ кардіоміоцитів щурів тодом диференціального рози [13]. У контрольній лінову фракцію нормаль у фракції ПМ, а також Лоурі. Вивчення активності вадили за Song і Badar на активність 5'-нуклеотид мембран (100 мкг білка, та 0,20 мкг білка відпо 90 хв при 37 °С. Всього Результати дослідів обр з використанням критері

Результати та їх обговорення

Показано, що γ-АСКС та тидази ПМ кардіоміоци жала від типу антитіл, міні інкубації з γ-НКС був більш виражений, н зи γ-НКС вірогідно (Р- на 18—20 %, великі доз титіл активність фермен з γ-НКС, та на 3—11 %

Залежність від тр більшості випадків визн булінів. Так, короткоча більший пригнічуючий до найменшого пригніче значенням та значенням

Наведені результати антитіла і нормальні ази, але нормальні — з обумовлений, можливо, жуть взаємодіяти з мо ген — антитіло та акти можливо, зв'язуються з кують його активні цент ла та інші білки, ефект мів. Можливо, специфі ють молекулу ферменту виник при зв'язуванні центрів ферменту з іні ками фракції γ-АСКС. ності 5'-нуклеотидази

Зміни відносної активності леотидази у плазматичних кардіоміоцитів щурів за ум протязом 5 хв (а), 60 хв (в) з γ-НКС (1) та γ-А малих (0,20 мкг білка, 1 (20 мкг білка, 2) дозах. К (100 %): * — $P < 0,001$ п контролем.

Досліди проведені на щурах лінії Вістар масою 200—250 г. Як антитіла до сарколеми кардіоміоцитів використовували гамма-глобулінову фракцію, яку виділяли із антисарколемальної кардіальної сироватки (γ -АСКС). Сироватку одержували імунізацією кролів ізольованими ПМ кардіоміоцитів щурів. Фракцію ПМ кардіоміоцитів одержували методом диференціального центрифугування у градієнті щільності сахарози [13]. У контрольних дослідженнях використовували гамма-глобулінову фракцію нормальної кролячої сироватки (γ -НКС). Вміст білка у фракції ПМ, а також у γ -АСКС та γ -НКС, визначали за методом Лоурі. Вивчення активності 5'-нуклеотидази у ПМ кардіоміоцитів провадили за Song і Badansky [15]. Вплив антитіл (γ -АСКС та γ -НКС) на активність 5'-нуклеотидази визначали за умов інкубації суспензії мембран (100 мкг білка) з антитілами у великих та малих дозах — 20 та 0,20 мкг білка відповідно. Інкубацію провадили протягом 5, 60 та 90 хв при 37°C. Всього проведено 76 визначень активності ферменту. Результати дослідів обробляли непараметричним методом статистики з використанням критерію Уайта [6].

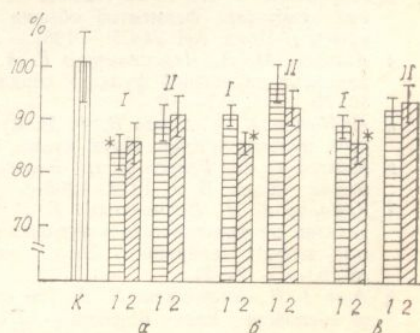
Результати та їх обговорення

Показано, що γ -АСКС та γ -НКС пригнічують активність екто-5'-нуклеотидази ПМ кардіоміоцитів (малюнок). Міра пригнічення більше залежала від типу антитіл, ніж від їх дози та часу дії на ПМ. За всі терміни інкубації з γ -НКС у великих і малих дозах пригнічуючий ефект був більш виражений, ніж з γ -АСКС у таких же дозах. Так, великі дози γ -НКС вірогідно ($P < 0,001$) знижували активність 5'-нуклеотидази на 18—20 %, великі дози γ -АСКС — на 6—8 %. При дії малих доз антитіл активність ферменту знижувалася на 16—20 % за умов інкубації з γ -НКС, та на 3—11 % — з γ -АСКС.

Залежність від тривалості дії антитіл на ПМ кардіоміоцитів у більшості випадків визначалася при інкубації з малими дозами γ -глобулінів. Так, короткочасна інкубація, протягом 5 хв, викликала найбільший пригнічуючий ефект, а інкубація протягом 60 хв призводила до найменшого пригнічення активності ферменту порівняно з вихідним значенням та значенням в інші строки інкубації.

Наведені результати свідчать, що специфічні до ПМ кардіоміоцитів антитіла і нормальні антитіла пригнічують активність 5'-нуклеотидази, але нормальні — значно більше. Ефект дії цих двох γ -глобулінів обумовлений, можливо, різними механізмами. Специфічні антитіла можуть взаємодіяти з молекулою ферменту за принципом реакції антиген — антитіло та активувати чи інактивувати її. Нормальні антитіла, можливо, зв'язуються з 5'-нуклеотидазою як рецептором клітини і блокують його активні центри. Оскільки γ -АСКС містить специфічні антитіла та інші білки, ефект його дії на фермент складається з двох механізмів. Можливо, специфічні антитіла у застосованих нами дозах активують молекулу ферменту, тим самим зменшують пригнічуючий ефект, що виник при зв'язуванні активних центрів ферменту з іншими білками фракції γ -АСКС. Від активності 5'-нуклеотидази залежить

Зміни відносної активності (%) 5'-нуклеотидази у плазматичних мембранах кардіоміоцитів щурів за умов інкубації протягом 5 хв (а), 60 хв (б) і 90 хв (в) з γ -НКС (I) та γ -АСКС (II) у малих (0,20 мкг білка, 1) і великих (20 мкг білка, 2) дозах. К — контроль (100 %); * — $P < 0,001$ порівняно з контролем.



вміст аденозину. Відомо [11], що аденозин послаблює розвиток контрактури міокарда при «кальцієвому парадоксі». Внаслідок підвищення концентрації аденозину (при активації 5'-нуклеотидази) зменшується кількість вільних іонів Са в міофібрилах. Зниження активності ектоферменту за умов дії антитіл може призвести до змін концентрації аденозину та через Na-Ca-обмінну систему до перерозподілу внутрішньоклітинної концентрації іонів Са.

Одержані нами результати дають змогу вважати, що одним із механізмів збільшення внутрішньоклітинної концентрації Са за умов дії антимембранних антитіл може бути їх блокуючий вплив на мембранний ектофермент. Це узгоджується з даними [2], які свідчать, що антимембранні антитіла призводять до підвищення тонічної напруги серцевого м'яза щура. Згідно теорії м'язевого скорочення, цей факт вказує на цитозольне збільшення кількості вільних іонів Са. До висновку авторів [2], що одним із механізмів реакції антитіл із антигеном клітинної мембрани кардіоміоцитів є пригнічення антитілами активності Na⁺,K⁺-АТФази, можна додати інгібуючий ефект на 5'-нуклеотидазу кардіоміоцитів. Останнє призведе до змін концентрації аденозину та внутрішньоклітинного перерозподілу іонів Са у бік збільшення їх кількості залежно від специфічності антитіл.

L. I. Aleksyuk, R. I. Yanchy, Yu. P. Bidzilya, V. S. Sukhina

EFFECT OF ANTIBODIES SPECIFIC TO SARCOLEMMMA OF CARDIOMYOCYTES OF RATS ON ACTIVITY OF 5'-NUCLEOTIDASE

Rabbit antibodies specific to sarcolemma of cardiomyocytes have been studied for their effect on activity of 5'-nucleotidase ecto-enzyme of the Wistar rat cardiomyocytes. It is shown that incubation of isolated plasma membranes of cardiomyocytes of rats (100 µg of protein) with the γ-globulin fraction of antisarcolemmal cardiac serum (γ-ASCS, 20 µg protein) and with the γ-globulin fraction of normal rabbit serum (γ-NRS, 0.20 µg protein) promotes a decrease of the enzyme activity. An inhibiting effect was greatly pronounced in incubation with γ-NRS and did not depend on the dose of antibodies and duration of their action. An assumption is made that inhibiting action of antibodies on activity of ecto-5'-nucleotidase may change adenosine concentration and may be one of elements in the mechanism promoting an increase of the intracellular calcium concentration.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антоненко В. Т. Изменения основных гемодинамических показателей при экспериментальном нейрогенно-аутоаллергическом инфаркте миокарда // Компенсаторные приспособления при патологии сердечно-сосудистой системы.— Минск, 1966.— С. 46—47.
2. Бідзіля Ю. П., Янчій Р. І., Лушнінова І. В. Дія специфічних антимембранних антитіл на тонічну напругу та фазні скорочення серцевого м'яза щура // Фізіол. журн.— 1992.— 38, № 4.— С. 89—92.
3. Дмитренко Н. П., Комиссаренко С. В., Уманский В. Ю. Субклеточное распределение некоторых ферментов обмена аденозина и АМР в лимфоцитах тимуса крысы // Докл. АН УССР.— 1981.— № 4.— С. 66—69.
4. Курский М. Д., Чередищенко Г. А., Воробец З. Д. О некоторых мембранных механизмах нарушений функции сердца иммунного генеза // Физиол. журн.— 1986.— 32, № 1.— С. 43—50.
5. Мойбенко А. А., Сагач В. Ф. Иммуные нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы.— Киев: Наук. думка, 1992.— 200 с.
6. Минцер О. П., Угаров Б. Н., Власов В. В. Методы обработки медицинской информации.— Киев: Б. и., 1982.— 208 с.
7. Ходоров Б. И., Воржовицкий Е. Г., Колкер И. И. и др. Цитотоксическое действие антител на электрическую активность миокарда в отсутствие комплемента: защитный эффект гепарина // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1971.— 72, № 10.— С. 17—21.
8. Arch I. R., Newsholme E. A. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine / Essay Biochem.— 1978.— 14.— P. 82—123.

9. Dornand J., Bonnafe J. C. 5'-nucleotidase isolated from Res. Commun.— 1978.— 82.
10. De Pierre J. W., Karnovsky nuclear leukocyte // J. Biol. 233.— P. 309—319.
11. Frich G. P., Lovenstein J. J. Biol. Chem.— 1976.— 252.
12. Jones S. R., Beasch H. R., lemma from vesicles of car P. 530—539.
14. Trams E. G., Lauter C. J. chem. et biophys. acta.— 19
15. Song S., Badansky O. Sui the rat liver // J. Biol. Chem.

Ин-т фізіології ім. О. О. Бого
АН України, Київ

ISSN 0201—8489. Физиол.

9. Dornand J., Bonnaïous J. C., Mani J. C. Effects of con A and other lectins on pure 5'-nucleotidase isolated from lymphocyte plasma membrane // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1978.—82, N 2.—P. 685—690.
10. De Pierre J. W., Karnovsky M. L. Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocyte // *J. Biol. Chem.*—1974.—249, N 22.—P. 7111—7129.
11. Gordon I. S. Extracellular ATP-effects sources and fates // *Biochem. J.*—1986.—233.—P. 309—319.
12. Frick G. P., Lovenstein J. M. Studies of 5'-nucleotidase in the perfused rat heart // *J. Biol. Chem.*—1976.—252, N 20.—P. 6372—6378.
13. Jones S. R., Beasch H. R., Fleming J. W. Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum // *Ibid.*—1979.—254, N 2.—P. 530—539.
14. Trams E. G., Lauter C. J. On the sidedness of plasma membrane enzymes // *Biochem. et biophys. acta.*—1974.—345, N 2.—P. 180—197.
15. Song S., Badansky O. Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver // *J. Biol. Chem.*—1967.—242, N 4.—P. 694—699.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця,
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 17.02.93