

М.Р. Клинико-иммунологические
головой травмы // Клин. хирургия.

Методы постановки реакции бла-
а. - 1983. - № 3. - С. 76-79.

- К.: Здоров'я, 1979. - 159 с.

Autoantibodies against H and M
of lesions into different sites of rat
59-62.

clear phagocytes release neurotoxins
system // Jour. of Neuroscience Re-

trauma and leucocytosis // Acta

ous system // Biomedicine and

gy Neurosurgery and Psychiatry. -

Матеріал надійшов
до редакції 10.02.97

УДК 612.127-008.9-097.3-085.273.57

Р.І.Янчій

Активирующий эффект антисарколемальных антител на скоротливые реакции папиллярных м'язів серця щура

В опытах на гиперпроницаемых папиллярных мышцах (ПМ) исследовали влияние антимембранных антител на их сократительные реакции. Сделано предположение, что увеличение амплитуды изометрического напряжения при действии специфических антител связано с их кальцийсвобождающей активностью из цистерн саркоплазматического ретикулума сердца крысы.

Вступ

З'ясування механізмів взаємодії антитіл з мембранними антигенними детермінантами має значення для імунології та патологічної фізіології. Це пов'язано з розкриттям патогенетичної ролі циркулюючих антитіл при аутоімунних захворюваннях, зокрема серцево-судинної і нервової систем [3-5]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що антикардіальні антитіла змінюють скоротливу здатність, трансмембранну проникливість кардіоміоцитів [2, 7], впливають на енергетичні процеси [8]. Показано, що початкова реакція клітинної мембрани на її взаємодію з антитілом пов'язана з активацією повільних Na-Ca каналів і, відповідно, підвищенням амплітуди скорочення та тонічного напруження. Але останнє не завжди супроводжувалося зміною мембранної проникливості для іонів Ca. Це стало основою для дослідження впливу антитіл на внутрішньоклітинний перерозподіл іонів Ca при дії специфічних антитіл. Зручним методичним підходом є застосування перфоративного пошкодження клітинної мембрани хімічними чинниками, зокрема сапоніном [11], що забезпечує доступ антитіл до мембран саркоплазматичного ретикулума (СПР). Передбачувалося, що антитіла специфічні до мембран СПР серця щура, здатні змінювати його кальційвивільняючу функцію. Цій проблемі і присвячене проведене дослідження.

Методика

Досліди проводили на хімічно скинованих за допомогою детергента сапоніну папілярних м'язах серця щура, що в загальному відповідає методам, описаним раніше [14]. Щурів-самців лінії Вістар після пентобарбіталової анестезії (75 мг/кг) декапітували, швидко вирізали серце і перфузували розчином Тіроде при 0-4 °C протягом 3-5 хв (для усунення залишків крові). Із субендокарда правого шлуночка виділяли папілярні м'язи діаметром 0,1-0,5 мм і довжиною 3-5 мм, які пізніше переносили в експериментальну плексигласову камеру з розчином Тіроде. Один кінець м'яза за допомогою лігатури з'єднували з меха-

ноелектричним перетворювачем сили типу 6Мх1С, а другий - з макрометричним гвинтом, що дозволяє регулювати довжину та силу розтягу препарату. Смужку розтягували до появи напруження, а потім ще на 20 % від вихідної довжини. Реєстрацію ізометричного скорочення проводили на самописці Н3021-4. Стимуляцію скорочення здійснювали за допомогою імпульсів струму силою, що в 2 рази перевищує порогову, тривалістю 5 мс, частотою 0,5 Гц. У такому режимі препарат «впрацьовувався» до стабілізації скорочення. В дослідях використовували 4 різних розчини: нормальний фізіологічний розчин Тіроде; релаксуючий безкальцієвий розчин, що містив ЕГТА; безкальцієвий розчин з сапоніном; тестуючий розчин, в якому були іони Са та антисарколемальні антитіла. Камера (об'ємом 1 см³), в якій знаходився м'яз, давала можливість швидко змінювати проточні розчини при швидкості перфузії 3 мл/хв. Досліди проводили при кімнатній температурі (22-23 °С). Основні розчини, в яких сарколема кардіоміоцитів ставала гіперпроникливою та розслаблюючою, складалися з (в ммоль/л): вільного Mg²⁺ - 3, Mg²⁺-АТФ - 5, фосфокреатину - 15, імідазолу - 20, ЕГТА - 10, а дитіотреїтолу - 0,5 і 50 мкг/мл сапоніну. Після насичення карбогеном рН розчинів був 7,2. Іонна сила розчинів доводилася до 0,16 моль/л метансульфонатом калію. Концентрація ЕГТА завжди була 10 ммоль/л, інкубаційні розчини розраховували за допомогою рівнянь [11]. У розчинах кальцій знаходився в поєднанні Са - ЕГТА і становив від 0,6 до 1,2 · 10⁻⁵ моль/л. Активність Na⁺, K⁺-АТФази визначали за нагромадженням неорганічного фосфату спруженим потенціометричним способом [2].

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів показав, що в нормальному інкубаційному розчині Тіроде папілярні м'язи серця щура на адекватні подразнення електричним струмом розвивали ізометричне напруження. Система СПР функціонувала нормально (захоплення та вивільнення іонів Ca), що засвідчують перші після стимуляції скорочення, амплітуда яких була завжди більшою, ніж до паузи. Заміна інкубаційного нормального розчину Тіроде на безкальцієвий викликала різке зниження амплітуди скорочень, які через декілька хвилин повністю зникали. Тонічне напруження підвищувалося, і після 5-хвилинної експозиції наступало

МхІС, а другий - з мак-
ати довжину та силу роз-
яви напруження, а потім
ацію ізометричного скоро-

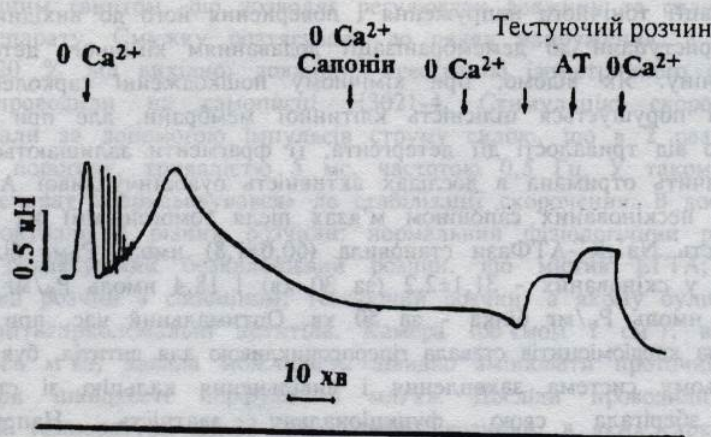
Стимуляцію скорочення
силою, що в 2 рази пе-
ою 0,5 Гц. У такому ре-
ції скорочення. В дослідах
ний фізіологічний розчин
що містив ЕГТА; без-
юзчин, в якому були іони
(об'ємом 1 см³), в якій
змінювати проточні роз-

Досліди проводили при
юзчини, в яких сарколема
розслаблюючою, складали-
-АТФ - 5, фосфокреатину
ейтолу - 0,5 і 50 мкг/мл
зчинів був 7,2. Іонна сила
льфонатом калію. Концен-
убаційні розчини розрахо-
нах кальцій знаходився в
о $1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Ак-
юмадженням неорганічного
бом [2].

ембран СПР серця шура
ім екстрактом високоочи-
, отриманих методом ди-
шільності сахарози [13].
після стандартизації тит-
менту 1:640. З імунних
садженням сірчанокислого
е і тестували за концен-
нтрольних дослідах вико-
ділену з сироватки крові
на деіонізованій воді.

му інкубаційному розчині
ватні подразнення елект-
руження. Система СПР
вільнення іонів Са), що
ня, амплітуда яких була
щійного нормального роз-
зке зниження амплітуди
гю зникали. Тонічне на-
юї експозиції наступало

його повільне зниження, яке продовжувалося до 40-ї хвилини. Після
стабілізації тонічного напруження і повернення його до вихідних зна-
чень приступали до демембранізації додаванням хімічного детергенту
- сапоніну. Як відомо, при хімічному пошкодженні сарколеми са-
поніном порушується цілісність клітинної мембрани, але при цьому,
залежно від тривалості дії детергента, її фрагменти залишаються, про
що свідчить отримана в дослідах активність оубаїнчутливої АТФази.
Так, у нескінюваних сапоніном м'язах після гомогенізації на холоді,
активність Na^+, K^+ -АТФази становила $(60,0 \pm 1,8)$ нмоль P_H мг білка/хв,
тоді як у скинованих - $31,1 \pm 2,2$ (за 30 хв) і $18,4$ нмоль P_H /мг білка $\pm$
 $\pm 1,43$ нмоль P_H /мг білка - за 50 хв. Оптимальний час, при якому
мембрана кардіоміоцитів ставала гіперпроникливою для антитіл, був 40 хв.
При цьому система захоплення і вивільнення кальцію зі структур
СПР зберігала свою функціональну здатність. Напруження
міокардіальних волокон розчинялося, коли концентрація вільного
кальцію в інкубаційному розчині становила $0,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л.
Максимальне напруження розвивалося при концентрації кальцію
 $1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Амплітуда ізометричного напруження при цьому ся-
гала до 60 % від вихідних значень. Як видно з рисунку, додавання
до тестуючого розчину специфічних антитіл викликало посилення
ізометричного напруження. Чутливість скоротливих міофібрил до ан-
титіл наступала при концентрації 0,1 мг/мл. Максимальне напруження
розвивалося за умов, коли концентрація антитіл в омиваючому розчині
не перевищувала 1 - 2 мг/мл. Додатковий приріст ізометричного на-
пруження при дії антитіл становив $38,9 \pm 6,1$ % ($P < 0,01$,
 $n = 10$). Проте амплітуда скорочення ніколи не сягала вихідних зна-
чень і була не більшою ніж 90 %. Збільшення концентрації антитіл
до 5 мг/мл не викликало додаткового посилення амплітуди
ізометричного напруження, а навпроти, його зменшення. В контрольних
дослідах аналогічні концентрації білка γ -глобулінової фракції,
виділеної з сироваток неімунізованих кролів (при відсутності антитіл),
не викликали вірогідних змін ізометричного напруження папілярного
м'яза. Отримані результати засвідчують, що антисарколемальні ан-
титіла, маючи доступ за наших умов досліду до структур СПР, вик-
ликають збільшення скорочення. Оскільки концентрація іонів Са в те-
стуючому розчині суворо регламентована ЕГТА, то отримані ефекти
можна пов'язати лише з додатковим збільшенням Ca^{2+} в ділянці
міофібрил, за механізмом індукованого його звільнення через антитіло-
чутливі депо СПР. Але збільшення амплітуди скорочення при дії ан-
титіл можливе за таких причин: антитіла, отримані до плазматичних
мембран, можуть взаємодіяти зі скоротливими білками СПР (актином
і міозином) і змінювати їх чутливість до іонів Са; антитіла,
фіксуючись на мембранах СПР, можуть реалізувати свою дію
внаслідок додаткового вивільнення Са зі структур СПР на взірць ко-
феїнчутливого чинника [12]. Правда, це не виключає і ще одного
регуляторного механізму сили скорочення не лише за рахунок зміни



Зміна амплітуди скорочення та тонічного напруження папілярного м'яза серця щура при демембранізації сапоніном та дії специфічних антисарколемальних антитіл (АТ). Концентрація антитіл у тестуючому розчині 1 мг білка/мл. По горизонтальній осі - час (хв), по вертикальній - амплітуда ізометричного скорочення на подразнюючий імпульс струму і тонічне напруження при дії іонів Са. Перше скорочення - швидкість руху паперової стрічки 1 см/100 мс, наступні 1 см/300 мс, подальші 1 см/10 хв. Стрілками позначено дію відповідного подразника.

спорідненості тропоніну С до Ca^{2+} , а також впливу на тривалість «життя» актоміозинового містка [9].

Виходячи з сучасних уявлень про механізми, що лімітують скоротливу здатність міофібрил, і отриманими в наших дослідках позитивних інотропних ефектів антитіл, посилення механічної активності може бути наслідком збільшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} або зміненої чутливості міофібрил до даного іону [11]. Умови наших дослідів, при яких активність СПР не була штучно обмежена, не дають точної відповіді, що є причиною посилення тонічної напруги при дії антитіл. Отримані результати можуть свідчити лише про те, що антитіла, специфічні до мембран СПР кардіоміоцитів щура, виявляють певний вплив на процеси взаємодії актинових і міозинових міофіламентів. Цей вплив може здійснюватися через зміну чутливості до іонів Са, місць їх зв'язування, зокрема на молекулах тропоміозину (активний міофіламен), що сприяє більш ефективній взаємодії міозинових головок з глобулярним актином, або, що більш вірогідно, на головках міозину і таким чином підвищуючи їх ферментативну активність щодо гідролізу АТФ. Таке припущення має однакове судження і на можливий вплив антитіл на додаткове вивільнення кальцію зі структур СПР. Так чи інакше, але отримане в попередніх наших експериментах [2] посилення тонічної напруги серцевого м'яза при дії антитіл з непошкодженою клітинною мембраною засвідчує внутрішньоклітинну зміну гомеостазу іонів Са. Крім того, важко собі уявити високу специфічність поліклональних антитіл в їх дії на ча-

сову тривалість актоміозинному відношенні а на них антитілам вл тивно інгібують Ca^{2+}

Виникає питання, кальцію? Або, якщо при цьому настає Якщо так, то за нор брани, антитіла, зниж кальцію в цистерни центрацію біля міофі скінованих м'язів і н рочення більш вірог вивільнення Ca^{2+} зі с що система викиданн станом Ca^{2+} [15], і киду скорочуючого іо

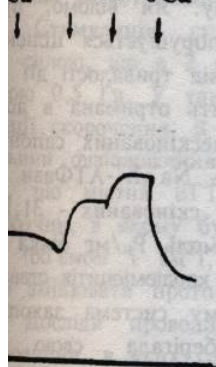
Скіновані папілярні бранних механізмів зміна може бути ли примембранних струк титіла специфічні до 2 мг білка/мл) по папілярного м'яза се шається за межею збільшення амплітуди мальних антитіл мож СПР. Подальші дослі і ініціаторів кальців дати відповідь на дос

R.I.Janchiy

EXCITATORY EFFECT OF THE CONTRACTILE RESP THE PAPILLARY CARDIAC

In experiments on the the antimembraneous has been found that contraction. Specific a Ca^{2+} from the sarcopl

A.A.Bogomolets Institute of Ph National Academy of Sciences

$$\text{Ca}^{2+} \quad \text{AT} \quad 0 \text{Ca}^{2+}$$


кож впливу на тривалість і ритмічності, що лімітують скоронаших дослідках позитивних іонної активності може бушньоклітинного Ca^{2+} або іону [11]. Умови наших штучно обмежена, не даєння тоничної напруги при відчити лише про те, що іміоцитів шура, виявляють і актинових і міозинових ся через зміну чутливості і молекулах тропоміозину ш ефективній взаємодії або, що більш вірогідно, шуючи їх ферментативну щення має однакове судгове вивільнення кальцію мане в попередніх наших и серцевого м'яза при дії мембраною засвідчує. Крім того, важко собі антитіл в їх дії на ча-

Виникає питання, а чи бере участь Ca^{2+} -помпа у вивільненні кальцію? Або, якщо антитіла змінюють роботу Ca^{2+} -АТФази, то чи при цьому настає зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію? Якщо так, то за нормальних умов функціонування плазматичної мембрани, антитіла, знижуючи активність Ca^{2+} -АТФ-залежного транспорту кальцію в цистерни СПР, можуть тим самим збільшувати його концентрацію біля міофібрил і, відповідно, силу скорочення. Але за умов скінтованих м'язів і наявності в розчині ЕГТА, додатковий приріст скорочення більш вірогідно можливий за однієї головної причини вивільнення Ca^{2+} зі структур СПР. Крім того є дані, які засвідчують, що система викидання Ca^{2+} зі структур ретикулума не пов'язана зі станом Ca^{2+} [15], і її блокада не перешкоджає кофеїнзалежному викиду скорочуючого іону з ретикулума.

Скіновані папілярні м'язи позбавлені дією хімічного детергенту мембранних механізмів транспорту кальцію і його внутрішньоклітинна зміна може бути лише внаслідок додаткового вивільнення з СПР і примембранних структур. Результати дослідження засвідчують, що антитіла специфічні до мембран СПР дозозалежно (в межах 0,1 до 2 мг білка/мл) посилюють амплітуду ізометричного напруження папілярного м'яза серця щура. Але першопричина цих змін залишається за межею проведених дослідів. Можна припустити, що збільшення амплітуди ізометричного напруження при дії антисарколемальних антитіл може бути пов'язане з вивільненням Са зі структур СПР. Подальші дослідження з використанням специфічних блокаторів і ініціаторів кальцієвого вивільнення з цистерн ретикулума зможуть дати відповідь на досліджувану проблему.

EXCITATORY EFFECT OF ANTISARCOLEMAL ANTIBODIES ON
THE CONTRACTILE RESPONSES OF
THE PAPILLARY CARDIAC MUSCLES IN RAT

A.A.Bogomolets Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Башина Б.М., Козлова И.А., Ключник Т.П. и др. Повышение уровня аутоантител к фактору роста нервов в сыворотке крови детей, больных шизофренией // Журн. неврологии и психиатрии. - 1997. - 97, № 1. - С. 47-51.
2. Бідзіля Ю.П., Янчій Р.І., Янчій О.Р. До мембранних механізмів розвитку тоничної напруги серцевого м'яза щура при дії антимембранних антитіл // Фізіол. журн. - 1995. - 41, № 3-4. - С. 67-75.
3. Голованова Н.К., Башарова Л.А., Кононова О.И. и др. Аутоантитела к ганглиозину G M3 исеротонину в сыворотке крови при атеросклерозе // Биохимия. - 1995. - 60, вып. 5. - С. 709-717.
4. Мойбенко А.А., Сагач В.Ф. Иммуногенные нарушения деятельности сердечно сосудистой системы. - К.: Наук. думка, 1992. - 202 с.
5. Рубцова М.Ю., Лобанова Д.С., Кюсс Т.Ю. и др. Сывороточные антитела к белковым антигенам мозга при детском церебральном параличе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1992. - № 4. - С. 395.
6. Солнцева Е.И., Позднякова А.Л., Савич В. и др. Изучение механизмов стимулирующего влияния противомозговых антител на Ca^{2+} - токи нейрональной мембраны // Там же. - 1987. - 54, № 11. - С. 537-539.
7. Янчій Р.И., Ильчевич Н.В. Влияние антимембранных антител на трансмембранный потенциал покоя и потенциал действия кардиомиоцитов // Физиол. журн. - 1984. - 30, № 5. - С. 625-634.
8. Янчій Р.И., Бідзіля Ю.П., Гоцуляк Я.Н. и др. Антитела ингибируют транспортные АТФ-зы сердца. - В кн.: Физиология и патология сердца и коронарного кровообращения. - К., 1992. - С. 202-203.
9. Brandt P.W., Cox R.N., Kawai M., Robinson T. Effect of Cross - Bridge Kinetics on Apparent Ca^{2+} Sensitivity // J. gen. Physiology. - 1982. - 79. - P. 997.
10. Cunningham Mcdeleine W., Antone Susan M. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses and human cardiac myosin // Proc. Nat. Acad. Sci USA. - 1992. - 89, № 7. - P. 1320-1324.
11. Fabiato A., Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle // J. Physiology. - 1978. - 276. - P. 233-255.
12. Gambassi G., Carhonin P. Modulation of myofilament Ca^{2+} interactions as a mechanism to increase myocardial contractility // Acta med. rom. - 1991. - 29, № 4. - P. 359-369.
13. Jones L.R., Beseh H.R., Jr. Fleming et al. Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. Comparative biochemical analysis of component activities // J. Biol. Chem. - 1979. - 254. - P. 530.
14. McClellan J.B., Winegrad S. The Regulation of the Calcium Sensitivity of the Contractile System in Mammalian Cardiac Muscle // J. gen. Physiology. - 1978. - 72. - P. 737.
15. Ungeheuer Martina, Migola Andrea, Hasselbach Wilhelm. Is the calcium pump involved in calcium release? // Naturforsch Z. - 1985. - 41, № 5-6. - P. 647-651.

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

Матеріал надійшов
до редакції 25.03.97

Особливості розви пересаженої селе реципіентам різно І. Вплив клітин ст

Изучали влияние кле
та на функциональн
модели гетерохронно
нии СВА/Са разног
капсулу почки живот
2, 5, 12 и 21 мес. У
после операции. По
вета к эритроцитам
от возраста реци
«молодых» клеток с
зенки стимулирован
ентов. Показано, ч
пересажены старым
ляционная связь ме
и концентрацией АО
ет на возможные
соотношении Т-клет
старых реципиентов
новорожденных до
менений в функци
старших возрастных

Вступ

Нині є велика кільк
системі при старінні
з атрофією тимуса,
жується їх проліфера
ваційні сигнали [18].
змінюється співвідно
субпопуляцій [13, 21].
[6, 15]. У той ж
лімфоїдних клітин, а
відповіді в організмі
особливе місце серед
потрапляє більшість
кістковий мозок і
клітинами між селез
чення цього показни