

Вплив антитіл на вихід Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулума папілярного м'яза серця щура

В опытах, проведенных на скинированных сапонином папиллярных мышцах сердца крысы изучали влияние антимембранных антител (АТ) на развитие тонического напряжения. Показано, что АТ вызывают усиление амплитуды изометрического напряжения сердечной мышцы. Блокирование высвобождения Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума (СПР), а также его предварительное истощение предотвращало развитие активирующего действия АТ. Сделан вывод, что АТБ, специфические к мембранам СПР, увеличивают амплитуду сокращения путем их кальциймобилизирующего действия.

Вступ

Дане дослідження є продовженням започаткованого циклу робіт [6, 11], які направлені на з'ясування дії антимембранных антитіл на електрофізіологічні властивості кардіоміоцитів. Зокрема, це стосується отриманого в попередній праці [12] активуючого ефекту антитіл на розвиток тонічного напруження гіперпроникливих м'язових волокон серця. Зроблено припущення, що антитіла, отримані до мембран саркоплазматичного ретикулума (СПР), викликають вивільнення іонів Ca з внутрішньоклітинних запасників, що проявлялося в збільшенні амплітуди ізометричного напруження серцевого м'яза. Ефективною моделлю, що дозволяє відтворювати скорочення без участі збудливих мембранных структур, задавати та контролювати концентрацію іонізованого Ca в міоплазмі, а також забезпечувати внутрішньоклітинний доступ антитіл є експериментально підготовлені гіперпроникливі волокна.

У цій роботі наведені результати досліджень дії антитіл, специфічних до мембран СПР, на розвиток осциляцій напруження папілярного м'яза серця щура.

Методика

Досліди проводили на гіперпроникливих папілярних м'язах серця щура, за загальноприйнятою методикою [12, 14]. Проведено дві серії експериментів: I - визначення впливу специфічних антитіл на кальцієву чутливість міофібрил скінованного м'яза серця щура (13 дослідів), II - їх кальційвивільнююча дія на структури СПР (14 дослідів). Для дослідження впливу антитіл на чутливість міофібрил до іонів Ca використовували його різні концентрації (від 0,5 до 10 мкмоль/л), які для зручності виражали за допомогою від'ємного логарифму (pCA).

Методичний підхід у цій групі дослідів мав такі особливості: папілярні м'язи після демембранізації сапоніном (50 мкг/мл протягом 50 хв) активували максимальною концентрацією Са (рСа 4,5), і записували їх ізометричне напруження. Після цього препарат перфузували стандартним розслаблюючим безкальцієвим розчином, що складався (в ммоль/л): 3 вільного Mg^{2+} , 5 MgАТФ, 15 фосфокреатину, 20 імідазолу, 10 ЕГТА, 0,5 дитіотреїтолу. Для відтворення скорочення до релаксуючого розчину додавали іони Са (рСа від 9 до 4,5) і реєстрували криві ізометричного напруження. Активуючий розчин вміщував іони кальцію в поєднанні з ЕГТА. Для отримання концентрації 10 ммоль/л (рСа 4,5), інкубаційні розчини розраховували за допомогою рівнянь [14]. Розчини з іншими концентраціями іонів Са готували змішуванням їх у певних пропорціях. Концентрація ЕГТА завжди суворо витримувалася (10 ммоль/л). Іонну силу розчинів доводили до 0,16 ммоль/л метансульфонатом калію. Після насичення карбогеном, рН розчинів був 7,2. Ступінь демембранізації тестували за активністю мембранних маркерів: оубаїнчутливої АТФази [4], і 5'-нуклеотидази [18].

Поліклональні антитіла отримували імунізацією кролів водно-солевим екстрактом очищених мембран СПР серця щура з використанням повного адьюванту Фрейнда. Концентрація антитіл в імунних сироватках, визначена в реакції зв'язування комплементу, становила 1:640. Із сироваток виділяли загальну γ -глобулінову фракцію, яку розводили тестуючим розчином, і використовували в трьох концентраціях (0,1; 1,0; 5,0 мг білка/мл). Для порівняння в контрольних дослідах використовували γ -глобулінову фракцію білка в аналогічних концентраціях, виділену з сироватки крові неімунізованих кролів. Стимуляцію смужок папілярного м'яза серця щура здійснювали надпороговими електричними імпульсами струму тривалістю 5 мс.

У другій серії дослідів з метою блокади вивільнення Са із СПР, мітохондрій і примембранних структур використовували рутеній червоний (3 мкмоль/л), а для його ініціації - кофеїн (4 ммоль/л) або рیانодін (1 мкмоль/л).

Результати дослідів обробляли непараметричним методом статистики з використанням критерію Уайта [7].

Результати та їх обговорення

Напруження міокардіальних волокон з'являлося при концентрації вільного Ca^{2+} у тестуючому розчині 0,6-0,8 мкмоль/л, а коли концентрація останнього в розчині коливалася в межах 9,5-10 мкмоль/л (рСа 4,7) розвивалося максимальне напруження (рис. 1, крива 1). Половина максимального напруження фіксувалася при рСа-5,3. Нахил кривої залежності відносного напруження від заданої концентрації кальцію не змінювався при додаванні до тестуючого розчину антитіл (0,1 мг білка/мл). Збільшення концентрації антитіл до 1 мг білка/мл спричиняло зсув кривої (див. рис. 1, крива 2) напруження вправо, особливо це спостерігалось при незначних концентраціях кальцію в

Рис. 1. Розв'язок від концентрації 5 мг білка/мл по осі ординат в інкубаційній

омиваючому інкубаційному спорідненому результату білка/мл). міофібрил, мальне на і не розв'язує 10 мкмоль що антиса чутливість дослідів [1] бути пов'язано Са. Особливі антитіла на великих концентраціях підтверджено показали, побігало р викликаной електростатичному лише останні мо

пільярні
50 хв)
исували
и стан-
вся (в
чу, 20
ння до
4,5) і
розчин
концен-
али за
нів Са
ЕГТА
нів до-
ичення
стували
[4], і

-сольо-
танннм
ироват-
1:640.
зводили
х (0,1;
викор-
раціях,
смужок
рични-

СПР,
черво-
л) або
истики

нтрації
и кон-
моль/л
1). По-
Нахил
нтрації
антитіл
лка/мл
вправо,
ьцію в

4, № 1-2

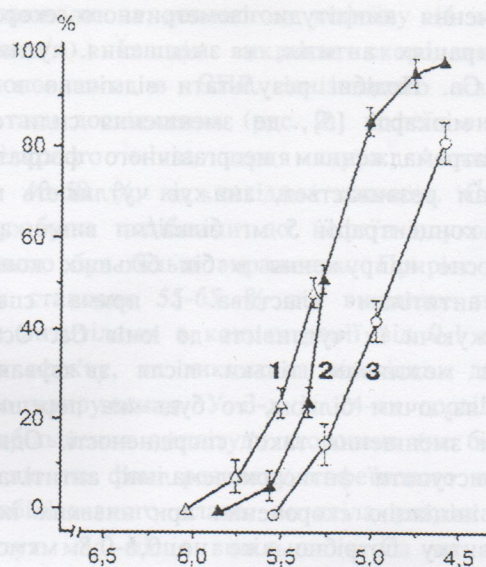


Рис. 1. Розвиток амплітуди відносного ізометричного напруження папілярного м'яза залежно від концентрації Ca^{2+} і при перфузії антитілами: 1 - без антитіл, 2 - до 1 мг білка/мл, 3 - 5 мг білка/мл. По осі абсцис - концентрація Ca^{2+} (виражена через від'ємний логарифм, pCa), по осі ординат - амплітуда напруження м'яза. За 100 % прийнята амплітуда напруження м'яза в інкубаційному розчині без антитіл.

омиваючому розчині. Збільшення концентрації кальцію в інкубаційному розчині (більше ніж pCa 5,5), не змінювало спорідненості іонів Са до скоротливих білків. Особливе значення мають результати дослідження дії великої концентрації антитіл (5 мг білка/мл). За таких умов антитіла знижували кальцієву чутливість міофібрил, зсуваючи криву напруження вправо на 0,4 pCa. Максимальне напруження волокон знижувалося на $16,4 \pm 3,1 \%$ ($P < 0,01$) і не розвивалося при дії іонів Са, коли їх концентрація була 10 мкмоль/л (див. рис. 1, крива 3). Результати дослідів свідчать, що антисарколемальні антитіла не підвищують, а навпаки знижують чутливість міофібрил до іонів Са. Отже, отримане в попередніх дослідках [12] посилення амплітуди ізометричного напруження не може бути пов'язане зі збільшенням чутливості скоротливих білків до іонів Са. Особливої уваги заслуговують результати про неефективний вплив антитіл на розвиток максимального напруження м'яза при відносно великих концентраціях іонів Са. Цей факт має своє логічне підтвердження в проведених раніше дослідках на нейронах [10]. Автори показали, що підвищення концентрації Са в омиваючому розчині запобігало розвитку порушення провідності нейрональної мембрани, викликаній антитілами. Вважають, що це може бути наслідком дії електростатичних сил відштовхування між іонами Са і антитілами. А тому лише при збільшенні концентрації антитіл до 5 мг білка/мл, останні можливо, здатні протидіяти утворенню Са-тропонінового комп-

лексу. Отримані результати доводять, що одним з можливих механізмів пригнічення амплітуди ізометричного скорочення м'яза при високих концентраціях антитіл, є зменшення чутливості скоротливих білків до іонів Са. Подібні результати відмічено в експериментах на ішемізованому міокарді [5], де зменшення сили скорочення автори пов'язують з нагромадженням неорганічного фосфату, який разом з ацидозом, що там розвивається, знижує чутливість міофібрил до іонів Са. Антитіла в концентрації 5 мг білка/мл викликали зміщення кривої рСа - відносно напруження в бік більших концентрацій Са. Це свідчить, що антитілам властива і пряма специфічна дія на міофібрили, знижуючи їх чутливість до іонів Са. Оскільки ініціювання скорочення стає можливим тільки після зв'язування Ca^{2+} зі специфічним Са-зв'язуючим білком, то будь-яка перешкода в цьому процесі є наслідком зменшення такої спорідненості. Одним із таких факторів можуть виступати антисарколемальні антитіла. При цьому останні блокують ініціацію скорочення при низьких концентраціях Ca^{2+} , і для його розвитку потрібно вже не 0,6-0,8 мкмоль/л Ca^{2+} , як за нормальних умов, а більше ніж 1 мкмоль/л. На наш погляд, це може бути пов'язане з екрануванням поля взаємодії Ca^{2+} із білком тропоніном за рахунок позитивно заряджених білкових центрів молекули антитіл. Таке судження є правомірним тому, що протимозкові антитіла знімали блокаду Ca^{2+} -каналів іонами Cd^{2+} [9]. Як стверджують автори, це може бути причиною послаблення зв'язування блокатора із селективним фільтром каналу під впливом антитіл. Можливо, антитіла, маючи структурну антигенну детермінанту, подібну до ділянок, що забезпечують взаємодію компонентів тропоніну один з одним і тропоміозином, можуть впливати на Ca^{2+} -зв'язуючі властивості міофібрил. Необхідно відзначити, що пригнічення ініціації розвитку скорочення папілярного м'яза антитілами при низьких концентраціях Ca^{2+} не може бути пов'язане з виснаженням ресурсів макроергічних сполук, оскільки концентрація АТФ у перфузуючому розчині постійно була достатньо високою (5 ммоль/л). Разом з тим встановлено, що антитіла при підвищенні концентрації в омиваючому розчині здатні безпосередньо впливати на кальцієву чутливість міофібрил. Така дія не може бути опосередкованою через мембранні структури, оскільки під час демембранізації останні значно пошкоджені. Зокрема, це і стосується α_1 -адренорецепторів, стимуляція яких викликає зниження кальцієвої чутливості міофібрил [8]. Звичайно, за умов перфорації клітинної мембрани сапоніном могли бути пошкоджені деякі розчинені в цитоплазмі чинники, що беруть участь у механізмі збільшення кальцієвої чутливості. Можливо, що в інтактних клітинах під дією антитіл проходять процеси, що можуть призвести до зниження або до підвищення чутливості міофібрил до іонів Са [6]. Все це засвідчує, що посилення амплітуди ізометричного напруження м'яза при дії антитіл не може бути пов'язане зі збільшенням чутливості міофібрил до іонів Са. Цей факт спонукав до проведення наступної серії дослідів, для в'яснення кальційвивільняючого ефекту антитіл.

Скорочення
релаксації
анодіну
мобілізації
засвідчили
напруженні
збільшення
на дію рСа
але ефект
ких умов
папілярного
після кофеїну
прирості тиску
ликали не
Слід відзначити
та досягнення
ляції. Можливо
також із
бранних сполук
же бути
мембранні
тивність
цілком в
демембранізації
то активні
засвідчує
і їх вплив
Особливої
Оскільки
клітини, т
ектоферменти
міжклітинні
в клітині
слабкое рСа
Як було
пригнічення
призвести
систему до
за наших
відсутній.
титіла викли
тенію через
спричинює
папілярного
Таким чином
при дії кофеїну
 Ca^{2+} , що в

Скорочення скінованих папілярних м'язів, які знаходилися у фазі релаксації, відтворювали за допомогою кофеїну (4 ммоль/л) або рیانодіну (1 мкмоль/л). Їх дія викликає скорочення кардіоміоцитів мобілізацією депонованого в СПР іонізованого кальцію [17]. Як засвідчили результати дослідження (рис. 2), кофеїн викликав осциляції напруження папілярного м'яза серця щура. Амплітуда скорочення збільшувалася на 40-50 % від вихідних значень. Скоротливі реакції на дію рیانодіну були подібними до кофеїн-індукованих осциляцій, але ефект останнього був більш вираженим. Приріст амплітуди за таких умов досліду становив 55-65 % від вихідних значень. Перфузія папілярного м'яза антитілами в концентрації від 0,1 до 5 мг білка/мл після кофеїнового ефекту, не викликала вірогідних додаткових змін у прирості тонічного напруження. У 3-х із 14-ти дослідів антитіла викликали незначне збільшення амплітуди скорочень (не більше ніж 10 %). Слід відзначити, що на фоні розвитку кофеїнового напруження м'яза та досягнення стабілізованого плато, антитіла викликали окремі осциляції. Можливо тут має місце вивільнення Са не лише із СПР, а також із інших клітинних запасників, зокрема мітохондрій і примембранних структур. Хоча таке твердження, що стосується останніх, може бути виключене тому, що після тривалої дії сапоніну клітинні мембрани руйнуються. І визначена в наших дослідях знижена активність мембранної Na^+ , K^+ -АТФази і маркера 5'-нуклеотидази цілком в цьому переконує. Якщо активність Na^+ , K^+ -АТФази після демембранізації становила не більше ніж 18 % від вихідних величин, то активність екто-5-нуклеотидази практично була відсутня. Це засвідчує, що клітинні мембрани майже повністю розчинені саноніном і їх вплив на кальцієві зміни в клітинному гомеостазі мало вірогідний. Особливої уваги заслуговує мембранний маркер 5'-нуклеотидаза. Оскільки цей фермент має активні центри, що знаходяться назовні клітини, то він і найбільше піддається впливові детергента. Крім того, ектофермент, як рецепторний білок, відіграє важливу роль у міжклітинних взаємодіях. Зокрема це стосується аденозину, вміст якого в клітині визначається активністю ектоферменту [15]. Останній послаблює розвиток контрактури міокарда при «кальцієвому парадоксі». Як було показано в наших дослідях [1], антитіла викликали пригнічення 5'-нуклеотидази. Зниження активності ектоферменту може призвести до зміни концентрації аденозину та через $\text{Na} - \text{Ca}$ обмінну систему до збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Са. Але за наших умов демембранізованих кардіоміоцитів такий механізм відсутній. Якщо після кофеїнового та рیانодінового напруження антитіла викликали окремі осциляційні скорочення, то після впливу рутенію червоного цього не спостерігалось. За таких умов антитіла не спричинювали ніяких змін скоротливих реакцій розслабленого папілярного м'яза.

Таким чином, розвиток механічного напруження скінованого м'яза при дії кофеїну або рیانодіну пов'язаний зі збільшенням цитозольного Ca^{2+} , що вивільняється з структур СПР. Оскільки цистерни СПР після

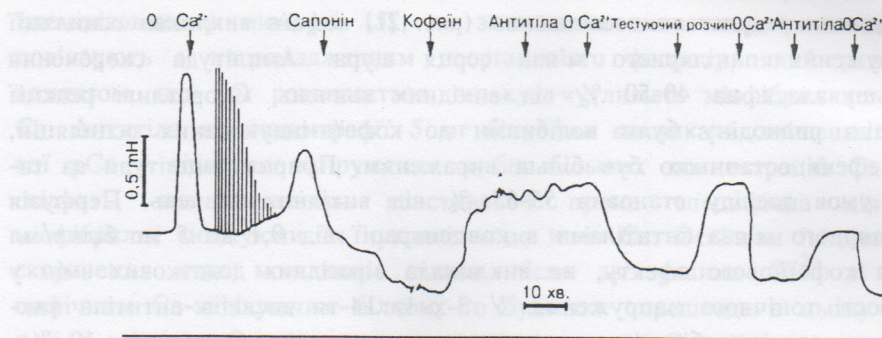


Рис. 2. Скоротливі реакції скінаного папілярного м'яза серця щура на дію кофеїну і антисарколемальних антитіл. Концентрація антитіл у перфузуючому розчині - 1 мг білка/мл, кофеїну - 4 ммоль/л, сапоніну - 50 мкг/мл. Стрілками показано початок дії різних подразників. На горизонтальній лінії - час (хв). На вертикальній - амплітуда ізометричного скорочення на подразнюючий імпульс струму і тонічне напруження.

дії кальційвивільняючих чинників були спустошеними на іони Са, антитіла при такому поєднанні не викликали властивого їм розвитку тонічного напруження серцевого м'яза. Крім того, антитіла не підвищували чутливості міофібрил до іонів Са і збільшення амплітуди скорочення не може бути причиною такої дії. Навпаки, антитіла при відносно високих концентраціях (5 мг білка/мл) зменшували чутливість міофібрил до іонів Са. Це дає підставу для ствердження, що одним із можливих механізмів посилення амплітуди скорочення м'яза при дії антисарколемальних антитіл є додаткове вивільнення іонів Са із СПР. Звичайно, це не виключає інших шляхів зміни внутрішньоклітинного кальцію при імуногенному пошкодженні серцевого м'яза. Зокрема, це стосується відповідної ролі каналних систем збудливих клітин. Експериментально була відмічена активація вхідного кальцієвого струму в кардіоміоцитах при дії антимембранних антитіл [11] і антитіл до переносника АДФ-АТФ [16]. Антитіла, отримані з сироватки хворих на аміотрофічний латеральний склероз викликали внутрішньоклітинні зміни в кальцієвому гомеостазі [13]. Такі антитіла дозозалежно збільшували концентрацію Ca^{2+} в мотонейронах, аксонах термінальних синаптичних пухирців, ендоплазматичному ретикулумі, мітохондріях і апараті Гольджі. Результати проведених дослідів підтверджують зроблене раніше припущення про кальційвивільняючу дію антитіл із внутрішньоклітинних запасників. Таке судження можливе за умов створення штучного доступу антитіл до внутрішньоклітинних мембранних структур СПР. А як це узгоджується при нормальному функціонуванні клітинної мембрани? Або настільки отримані результати можна перенести на випадок збереження бар'єрної

функції мем-
ликих білк-
мальних
фіксуючись
рушення
дослідженн-
змінюється
рюються у
Таким ч-
(крім мемб-
ротливу
внутрішньо-
іонів Са б

Висновки

1. Антисар-
трації 0,1
до іонів С
2. При
наступає з
3. Дослід-
вивільненн-
тим самим
ця щура.

R.I.Janchy

ANTIBODIES
FROM SARCO-
IN THE PAPI-

In experim-
rat's heart
for the s
protein/ml)
isometric P
previous rel
Thus, AB
cellular mol

A.A.Bogomoletz
Kiev

СПИСОК ЛІТ

1. Алексюк Л
кардіоміоц
- С. 82-85.

функції мембрани, що запобігає проникненню в клітину відносно великих білкових комплексів (60-90 кДа), якими є антитіла. За нормальних умов функціонування плазматичної мембрани антитіла, фіксуючись на мембранних антигенних детермінантах, викликають порушення її проникливості, що переконливо доведено в багатьох дослідженнях і вже не викликає ніяких сумнівів. При цьому змінюється активність іонотранспортних і енергетичних систем і створюються умови для проникнення антитіл.

Таким чином можна вважати, що одним із важливих механізмів (крім мембранних) активуючої дії антисарколемальних антитіл на скоротливу здатність є їх кальційвивільняючий ефект із внутрішньоклітинних депо СПР, зумовлюючи збільшення концентрації іонів Са біля міофібрил і, відповідно, амплітуду скорочення.

Висновки

1. Антисарколемальні антитіла, отримані до мембран СПР в концентрації 0,1 мг білка/мл не впливають на чутливість скоротливих білків до іонів Са.

2. При підвищенні концентрації антитіл від 1 до 5 мг білка/мл настає зниження чутливості міофібрил до іонів Са.

3. Досліджено, що специфічні до мембран СПР антитіла викликають вивільнення іонів Са з внутрішньоклітинних запасників, посилюючи тим самим амплітуду ізометричного напруження папілярного м'яза серця щура.

R.I.Janchy

ANTIBODIES MOBILEZE Ca^{2+} FROM SARCOPLASMIC RETICULUM IN THE PAPILLARY MUSCLE OF THE RAT'S HEART

In experiments of skinned with saponin papillary muscles (PM) of the rat's heart we studied the effects of antibodies (AB), which are specific for the sarcoplasmic reticulum's membranes (SPR). AB (1-5 mg protein/ml) have been established to enhance the amplitude of the isometric PM tension. Inhibition of the Ca^{2+} release from SPR and its previous release prevented the development of the exciting effect of AB. Thus, AB increase the amplitude of PM contraction due to their intracellular mobilizing action.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology Nat. Acad. Sci.,
Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексюк Л.І., Янчій Р.І., Бідзіля Ю.П. та ін. Вплив антитіл, специфічних до сарколеми кардіоміоцитів щурів, на активність 5'-нуклеотидази // Фізіол. журн. - 1993. - 39, № 5-6. - С. 82-85.

2. Берштейн С.А., Соловьев А.И., Базилюк О.В. Релаксующий эффект снижения оксигенации скинированных сосудистых гладких мышц, несвязанный с изменением концентрации Ca^{2+} в миоплазме // Там же. - 1983. - 29, № 6. - С. 744-746.
3. Бідзіля Ю.П., Янчій Р.І., Янчій О.Р. До мембранних механізмів розвитку тоничної напруги серцевого м'яза щура при дії антимембранних антитіл // Там же. - 1995. - 41, № 3-4. - С. 67-75.
4. Болдырев А.А. Транспортные аденозинтрифосфатазы. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977. - С. 69-78.
5. Векслер В.И., Елизарова Е.П., Капелько В.И. Влияние фосфата и ацидоза на кальциевую чувствительность миофибрилл сердца // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1985. - 49, № 2. - С. 133-135.
6. Ильевич Н.В., Лысяный Н.И., Янчій Р.И. Антитела и регуляция функций организма. - К.: Наук. думка, 1986. - 248 с.
7. Минцер О.П., Угаров Б.Н., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации. - К., Б.И., 1982. - 208 с.
8. Орехова И.В., Векслер В.И. Влияние α_1 -стимуляции и лития на кальциевую чувствительность миофибрилл сердца // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1991. - 62, № 11. - С. 478-480.
9. Солнцева Е.И., Познякова 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.
10. Штарк М.Б. Иммунонейрофизиология. - Л.: Медицина, 1978. - С. 176.
11. Янчій Р.И., Ильевич Н.В. Влияние антимембранных антител на трансмембранный потенциал покоя и потенциал действия кардиомиоцитов // Физиол. журн. - 1984. - 30, № 5. - С. 625-634.
12. Янчій Р.І. Активуючий ефект антисарколемальних антитіл на скоротливі реакції гіперпроникливих папілярних м'язів серця щура // Там же. - 1997. - 43, № 5-6. - С. 11-16.
13. Engelhardt J. L., Siklos L., Komuves et al. Antibodies to calcium channels to increase selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons // Synapse. - 1995. - 20, № 3. - P. 185-199.
14. 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.
15. Jordon J.S. Extracellular ATP-effects sources and fates // Biochem. - 1986. - 233. - P. 309-319.
16. Morad M., Davies N.W., Ulrich G., Sehultheiss. Antibodies against ADP-ATP carrier enhance Ca^{2+} current in isolated cardiac myocytes // Amer. J. Physiol. - 1988. - 24, № 4. - P. 960-964.
17. Saxon M., Kibrinsky E. Rianodine as a trigger of tension oscillations in rat ventricular muscle // Eur. J. Pharmacol. - 1988. - 150, № 3. - P. 331-333.
18. Song S., Badansky O. Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver // J.Biol.Chem. - 1967. - 242, № 4. - P. 694-699.

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

Матеріал надійшов
до редакції 9.06.97