

В. П. Ляшенко, С. М. Лукашов

Вплив стресу на кальцієвий гомеостаз м'язових тканин

На крысах, которые находились под действием стрессового фактора, на протяжении 21 нед изучали динамику содержания кальция в аорте, сердце и поперечно-полосатой мышце. Во всех исследуемых органах наблюдалось увеличение содержания кальция почти в 7 раз к середине исследования и его уменьшение к 21-й неделе, что может быть связано с формированием стадий стресса и как следствием – гиперхолестеринемией. Использование блокатора кальциевых каналов L- типа нифедипина не изменяло качественный характер наблюдаемой динамики, но уменьшало её количественные показатели, особенно на заключительных этапах исследования. Сделано предположение о возможных механизмах поддержания кальциевого гомеостаза в изучаемых органах в условиях протекания стадий стресса путем активной работы лиганд- и потенциалзависимых кальциевых каналов.

ВСТУП

В результаті багатьох клітинних біохімічних реакцій підвищується внутрішньоклітинна концентрація кальцію під впливом гуморальних і нервових сигналів [1]. Такий механізм може бути універсальним для функціонування всіх клітин організму. Тому сталість концентрації іонів кальцію в клітині дуже ретельно підтримується. Нині розкрито і обґрунтовано декілька шляхів входу іонів кальцію в клітину – через іонні канали, за допомогою переносника, Na^+ – K^+ -обміну, а також із внутрішньоклітинних депо [1, 2]. Який із цих шляхів буде реалізовуватися залежить від стану клітини, якості діючого агента, а також сили та тривалості його дії. Більшість досліджень у цьому напрямку було виконано на окремій клітині чи культурі клітин, оскільки це дозволяє уникнути небажаних впливів і виключити дію інших агентів. Однак слід зазначити, що дослідження, виконані на цілісному організмі, зводять до мінімуму розбіжність реакцій, які отримані на культурі клітин і в цілісній системі.

© В. П. Ляшенко, С. М. Лукашов

Кальцій займає важливе місце ще й у вторинному опосередкуванні захисно-адаптаційної відповіді на стрес, оскільки запускає необхідний ферментативний каскад реакцій [3, 4]. Така відповідь включає як вегетативний, так і соматичний компоненти. Тобто будуть спостерігатися зсуви кальцієвого гомеостазу в багатьох тканинах, в тому числі і м'язових.

Метою нашої роботи було вивчення динаміки вмісту кальцію в серці, аорті та соматичних м'язах щурів за умов стресу і визначення можливих механізмів змін через блокування кальцієвих каналів ніфедипіном.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на білих щурах-самцях масою 125 – 275 г, яких розділили на три групи. До I групи ввійшли контрольні тварини (58 щурів). Тваринам II групи (76 щурів) створювали стресову ситуацію обмеженням життєвого простору до 8 – 10 см² на одну особину (така ситуація – сильний стресовий стимул) [5]. Разом з тим ці тва-

рини зі звичайним раціоном харчування отримували кухонну сіль (2 г/кг) [6]. До III групи ввійшли щури (38 тварин), які теж знаходилися під впливом стресового фактора. Паралельно, для виявлення можливих механізмів змін кальцієвого гомеостазу м'язових тканин за умов стресу, вони отримували ніфедипін у дозі 2 мг/кг на добу. Препарат, розведений у 1 % крохмального слизу, вводили зондом усередину.

Експеримент тривав 21 тиж з фіксацією результатів кожні 3 тиж. В зазначених часових інтервалах тварин декапітували і забирали для дослідження аорту, серце та поперечно-смугастий м'яз. Серце й аорту брали повністю, не відокремлюючи гладеньком'язовий шар в аорті та міокард у серці від інших тканин. Поперечно-смугастий м'яз досліджували на прикладі м'язів стегна, виключаючи з них зв'язки, нерви та сухожилля. В досліджуваних органах визначали вміст кальцію за методом атомно-абсорбційної спектроскопії [7]. Всі дослідження проводилися вранці, натще, у тварин III групи через

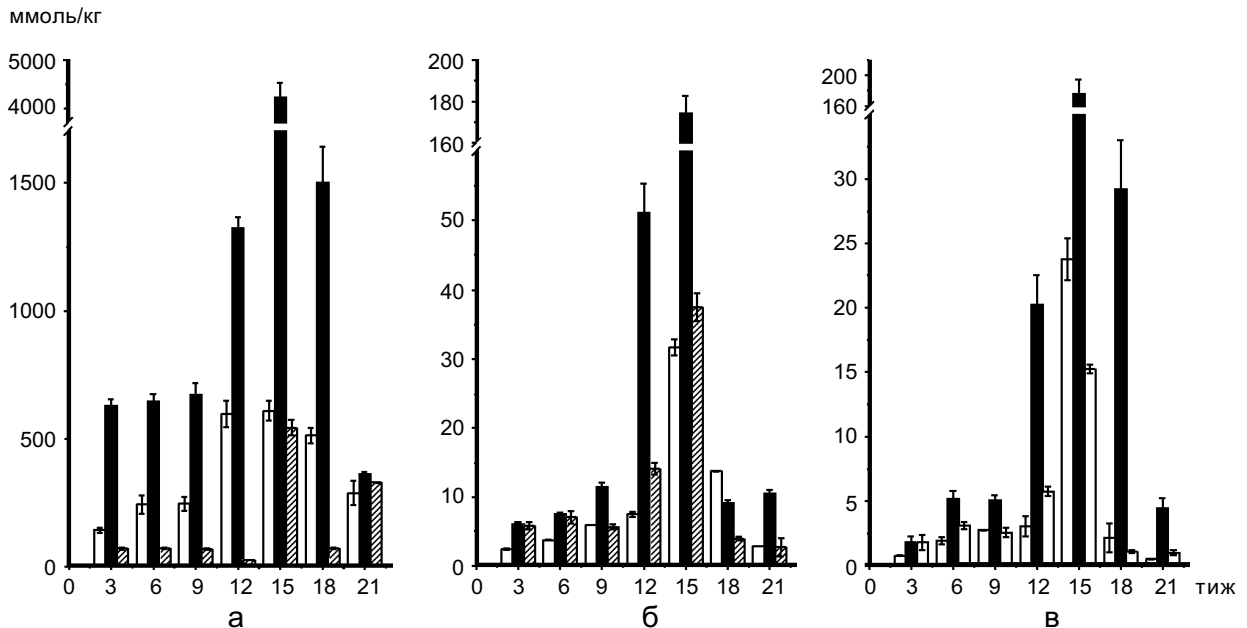
одну годину після прийому ніфедипіну, оскільки максимум його ефекту досягається через 1 – 2 год.

Статистичну обробку результатів здійснювали методом парних порівнянь. Зміни вважалися достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення динаміки вмісту кальцію в аорті у тварин представлено на рисунку, а.

У тварин контрольної групи спостерігається поступове, плавне накопичення кальцію в аорті з 3-го по 15-й тиждень дослідження ($610,78 \text{ ммоль/кг} \pm 38,36 \text{ ммоль/кг}$). На пізніх етапах експерименту (з 18-го по 21-й тиждень) вміст кальцію в аорті знижувався майже до початкових значень. Очевидно, така динаміка вмісту кальцію пов'язана з фізіологічними процесами, зумовленими тривалістю експерименту (21 тиж). Дійсно, було показано, що функціональна характеристика основних кальційтранспортних систем гладеньком'язових клітин судин,



Динаміка вмісту кальцію в аорті (а), серці (б) і в поперечно-смугастому м'язі (в) щурів 1, 2 та 3-ї груп. За віссю абсцис – час від початку досліду (тиж); за віссю ординат – концентрація кальцію в аорті (ммоль/кг сухої маси)

структурний стан їх мембран і механізми трансмембранної передачі гормональних сигналів мають деякі вікові особливості [5, 8]. Так, з віком відбувається збільшення спорідненості кальцієвого насоса плазматичних мембран гладеньком'язових клітин аорти щурів до іонів кальцію, а також зміна еластичних властивостей судин, що збільшує їх спорідненість до кальцію і може призвести до його акумуляції в стінці аорти [9].

У тварин II групи спостерігалась аналогічна динаміка вмісту кальцію в аорті, але з більш високими кількісними показниками. Вміст кальцію в аорті у тварин цієї групи на максимумі накопичення – 15 тиж – перевершував значення відповідного показника у тварин контрольної групи в 6 разів і становив $4223,66 \text{ ммоль/кг} \pm 312,73 \text{ ммоль/кг}$. Як зазначалось у наших попередніх дослідженнях [6, 10], постійно діючий фактор викликає стійку гіперхолестеринемію, яку можна розглядати як захисну реакцію організму. Така ситуація може призводити до підвищення жорсткості мембран і змін її конформації [11], зниження реакційної спроможності клітин, гальмування роботи Ca^{2+} -АТФаз [12], зменшення електричної стабільності мембран, що супроводжується їх пробоем і утворенням нових каналів іонної провідності [2]. Все це сприяє накопиченню кальцію в стінці аорти, що починається з порушення його транспорту через ендотеліальний бар'єр [9, 12]. Можливо, що саме з цими процесами пов'язана акумуляція кальцію в аорті у тварин II групи. Збільшене входження кальцію з кровоносного русла в ендотеліальні клітини призводить до поступового підвищення його концентрації в колагеновому й еластичному прошарках, які виконують захисну функцію відносно гладеньком'язових клітин. Надмірне зосередження кальцію в еластичних волокнах аорти може викликати також їх гіперплазію [9]. При наявності постійно дію-

чого стресора кальцій поступово починає накопичуватись і в гладеньком'язовому шарі. Цьому сприяє як виникаюча гіперхолестеринемія, так і підвищення фракції ліпопротеїдів низької щільності, які спричинюють “закачку” кальцію в клітину [11, 13]. Неабияким механізмом накопичення кальцію в гладеньком'язових клітинах може бути ендотеліальна дисфункція, яка виражається в підвищенні вмісту ендотеліну та зниженні вмісту оксиду азоту (NO), що також спостерігається при гіперхолестеринемії [12, 14]. Ендотелін викликає звільнення іонів кальцію з внутрішньоклітинних депо і вхід цього катіона з позаклітинного простору. Ці ефекти посилюються і зі зниженням продукції NO [14]. Свій внесок у збільшення вмісту тканинного кальцію може також робити і перекисне окиснення фосфоліпідів клітинних мембран [15, 16], оскільки гіперхолестеринемія різко збільшує вміст продуктів перекисного окиснення і зменшує концентрацію антиоксидантів [11]. Це, на думку багатьох авторів, призводить до утворення іонофорів щодо іонів кальцію і протонів, внаслідок чого підвищується проникність клітинних мембран для цих іонів, що викликає посилену акумуляцію кальцію в тканинах [2, 15].

Наведені вище механізми будуть включатись у роботу з перших часів впливу стресових агентів, що дає підставу говорити про підвищення вмісту тканинного кальцію з 3-го по 15-й тиждень експерименту, більшою мірою внаслідок збільшення внутрішньоклітинного, а не позаклітинного кальцію. Повільне підвищення вмісту кальцію з 3-го по 9-й тиждень дослідження ще говорить про якісну роботу механізмів виведення кальцію з клітини. Але виснаження шляхів енергозабезпечення клітини за умов тривалої дії стресора стосується і цих механізмів [4]. Тому різке збільшення акумуляції кальцію з 12-го по 15-й тиждень може бути викликано як збільшенням його входження в клітину, так і зменшенням його виходу

внаслідок ушкодження механізмів виведення кальцію з клітини. Так чи інакше, перевантаження клітин кальцієм може стимулювати їх загибель [1, 2, 17]. Ймовірно, що в результаті цього кальцій може виходити у міжклітинний простір, звідки він вимивається течією крові або мобілізується завдяки впливу паратгормону. З цього моменту починається “тканинний остеопороз”, який проявляється в поступовому зниженні вмісту тканинного кальцію у тварин II групи з 18-го по 21-й тиждень дослідження.

На рисунку представлено зміни вмісту кальцію в серці у тварин дослідних груп. У тварин контрольної групи динаміка рівня кальцигестії в серці подібна динаміці його утримання в аорті, що може бути пов'язано однотипністю змін обміну речовин в цих органах під час проведення експерименту, а також подібністю на 80 % амінокислотного складу Ca^{2+} -АТФаз серця і аорти [1, 18]. Така подібність динаміки спостерігалася також і у тварин II групи. На наш погляд, причинами цього можуть бути аналогічні механізми підтримання кальцієвого гомеостазу в клітинах аорти і серця за умов стресу.

Динаміка вмісту кальцію у поперечно-смугастому м'язі (див. рисунок, в) також схожа на зміни його концентрації в аорті та серці. Така аналогія підтверджується даними кореляційного аналізу. Коефіцієнт кореляції в парі органів серце – скелетний м'яз становила 0,93, аорта – скелетний м'яз – 0,86, аорта – серце – 0,85.

Слід зазначити кількісно різні значення утримання кальцію в неоднакових органах тварин контрольної групи. В поперечно-смугастому м'язі це одиниці, в серці – десятки, а в аорті – сотні ммоль на кілограм сухої маси. На наш погляд це, в першу чергу, пов'язано з будовою досліджуваних органів, а саме зі збільшенням еластичних і колагенових волокон і зменшенням м'язових. На відміну від останніх,

еластичні та колагенові волокна вже в своїй структурі містять багато кальцію, а також можуть його акумулювати у великій кількості [9, 18]. Відомо, що більш потужний у функціональному відношенні орган буде мати вихідний низький рівень кальцію, оскільки навіть незначні коливання його концентрації будуть призводити до суттєвих функціональних реакцій. У порядку зменшення функціональних реакцій і їх амплітуд досліджені органи будуть утворювати такий ряд: аорта, серце, поперечно-смугастий м'яз. Важливо відзначити, що морфо-функціональні відмінності стосуються не тільки тканинного рівня, а й клітинного і субклітинного: спостерігається різний розвиток ендоплазматичного ретикулула [18-20], різна активність роботи $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника і кількість Ca^{2+} -АТФаз [21], різний розвиток кальцієвого буфера [1, 2] тощо.

Динаміка накопичення кальцію в органах тварин II групи має однакові якісні показники, що можна розглядати у зв'язку з розвитком стадій стресу [4, 6] у вивчених органах.

Для розкриття можливих шляхів надходження кальцію в клітини за умов розвитку захисно-компенсаторних реакцій ми використовували блокатор кальцієвих потенціалзалежних каналів L-типу – ніфедипін. Застосування обраного блокатора пояснюється розповсюдженістю даних каналів у серці, скелетних м'язах і гладеньком'язових клітинах аорти [1, 18, 21].

Зміни утримання кальцію в аорті, серці і поперечно-смугастому м'язі (див. рисунок) за умов застосування ніфедипіну дозволяють припустити наступний механізм явищ, які спостерігалися. Оскільки в серці і поперечно-смугастому м'язі тварин, що приймали ніфедипін (III група) вміст кальцію з 3-го по 9-й тиждень практично не змінювався порівняно з II групою, то можна припустити, що до цього причетні

більшою мірою лігандзалежні канали. Порівняння цих явищ з 12-го по 21-й тиждень наводить на думку про активне включення до даних процесів потенціалзалежних кальцієвих каналів. Протягом цих тижнів прийом ніфедипіну знижував вміст кальцію в серці і поперечно-смугастому м'язі майже в 2 – 3 рази щодо значень тварин, котрі знаходились у стресовому стані (II група). Цей рівень в досліджуваних органах з 15-го по 21-й тиждень був навіть нижчим, ніж у тварин контрольної групи. Отже, з часом, навіть за нормальних фізіологічних умов, превалюють механізми кальцієвого гомеостазу, зумовлені роботою потенціалзалежних каналів. Тобто кальцієвий гомеостаз в серці і поперечно-смугастому м'язі на ранніх стадіях стресу забезпечується в основному лігандзалежними механізмами, а на пізніх – потенціалзалежними. На наш погляд, така ситуація ґрунтується на структурно-функціональних змінах мембран. Як було зазначено, ендогенна гіперхолестеринемія, що виникає за умов стресу, змінює певним чином не тільки морфологічні [1, 11], а й функціональні характеристики мембран [12, 15]. У наших дослідженнях зазначалося [6, 10], що на перших стадіях стресу, при збереженні енергозабезпечення, гіперхолестеринемія ще не має таких глобально високих значень, здатних істотно впливати на мембрани. На пізніх стадіях вміст холестерину в сироватці крові підвищується в 2,5 – 3 рази і стабільно тримається на цьому рівні до кінця дослідження. Дуже вірогідно, що за таких умов роль лігандзалежних каналів мембрани буде мінімальною [11, 13, 15].

В аорті під впливом ніфедипіну спостерігалась дещо інша картина накопичення кальцію (див.рисунок). Там уже з початку дослідження вміст кальцію у тварин III групи був нижчим, ніж у тварин II групи і навіть у тварин I контрольної групи. Така різниця в динаміці утримання кальцію в аорті порівняно з цією величиною в серці

та поперечно-смугастому м'язі може бути викликана декількома причинами. По-перше, не виключена ситуація, що в аорті за умов стресу кальцієвий гомеостаз буде підтримуватися більшою мірою за рахунок роботи потенціалзалежних каналів. По-друге, може статися, що в аорті кількість потенціалзалежних каналів більша, ніж лігандзалежних. По-третє, картина, яку ми спостерігали, може бути пов'язана зі структурними особливостями аорти. За функціональною класифікацією аорта відноситься до типу амортизуючих судин. Такі судини характеризуються великим вмістом еластичних волокон і невеликим відсотком м'язових клітин [1, 9, 18]. Ця кількість гладеньком'язових клітин не спроможна чинити сильних скорочувальних рухів і впливає, головним чином, на еластичні властивості аорти. Тобто активною, в функціональному плані, буде саме ця невеличка кількість гладеньком'язових клітин. Еластичні та колагенові волокна, хоч і утримують більшу частину кальцію, зосередженого в аорті, але не будуть реагувати на застосування ніфедипіну. По-четверте, аорта характеризується меншою щільністю іннервації [18]. В аорті іннервуються лише адвентиціальна оболонка та зовнішні прошарки середньої оболонки. На більшу частину гладеньком'язових клітин симпатичні нерви здійснюють непрямий вплив, опосередкований електротонічними механізмами. Таким чином, підвищення вмісту кальцію в аорті за допомогою надходження через лігандзалежні механізми є дуже обмеженим.

Представлені можливі гіпотетичні механізми кальцієвого гомеостазу м'язових тканин цілісного організму за умов стресу дозволяють припустити деякі аспекти адаптаційно-компенсаторної відповіді організму та важливі риси очікуваних реакцій, а також зумовлюють потенційне застосування фармакотерапії на різних стадіях стресу.

V.P.Lyashenko, S.M.Lukashov

EFFECT OF STRESS ON CALCIUM HOMEOSTASIS IN MUSCULAR TISSUES

A dynamics of the content of calcium (Ca) in aorta, heart and skeletal muscles was studied in rats exposed to a stress factor for 21 weeks. We observed a 7-fold increase in its content in all the organs examined by the middle of an experiment and its progressive decrease by the 21-st week. It might result from the stages of stress and development of hypercholesterinemia. An inhibitor of L-type calcium channels nifedipine did not change the dynamics of Ca content qualitatively but it decreased its quantitative parameters, especially at final stages of experiments. We suggest that possible mechanism of keeping calcium homeostasis in the organs examined at different stages of stress is an intensive work of ligand- and potential-dependent calcium channels.

Dnepropetrovsk National University (Ukraine)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдонин П. В., Ткачук В. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. – М.: Наука, 1994. – 288 с.
2. Атаман А. В. Потребление кислорода стенкой артерий и вен у кроликов и крыс разного возраста в ранние сроки развития экспериментального атеросклероза // Фізіол. журн. – 1987. – 33, № 3. – С. 96–100.
3. Білокінь Н. С., Федорченко О. Є. Стан мембран ядер гепатоцитів білих щурів різного віку в умовах гіпокінезії. – В кн.: Тези доп. III з'їзду Укр. біофіз. т-ва, Львів, 2002. – С. 151.
4. Вавілова Г. Л., Прокопенко О. М., Харламова О. М. Участь L-аргініну в корекції активації мембранних транспортних ферментів Na^+ , K^+ , Ca^{2+} - та Na^+ -АТФаз за умов експериментальної гіперхолестеринемії // Фізіол. журн. – 2000. – 46, № 1. – С. 25–31.
5. Вихерт А. М., Седов К. Р., Соколова Р. И. Кальциноз артерий (аорты и коронарных сосудов). – М.: Медицина, 1970. – 152 с.
6. Дьячук Г. И. Возможные пути регуляции кальциевого обмена // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1991. – 77, № 11. – С. 117–123.
7. Калинин М. И., Рогозкин В. А. Биохимия мышечной деятельности. – К.: Здоров'я, 1991. – 231 с.
8. Курский М. Д. Регуляция внутриклеточной концентрации кальция в мышцах. – К.: Наук. думка, 1989. – 144 с.
9. Курский М. Д. Транспорт кальция и функция гладких мышц. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
10. Левицкий Д. О. Биохимия мембран. Кальций и биологические мембраны. – М.: Наука, 1990. – 124 с.
11. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А. и др. Холестериноз. – М.: Медицина, 1983. – 352 с.
12. Мірошніченко А. О., Ляшенко В. П., Лукашов С. М. Порівняльне дослідження накопичення кальцію у тканинах головного мозку та печінки за умов аліментарної гіперхолестеринемії // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 4. – С. 28–32.
13. Никонов В. В. Стресс. Современный патофизиологический подход к лечению. – Харьков.: Консум, 2002. – 240 с.
14. Сагач В. Ф. Эндотелий та серцево-судинні порушення // Фізіол. журн. – 1998. – 44, № 4. – С. 110.
15. Селявко В. В. Структурно-функциональное состояние плазматических мембран ГМК аорты при старении. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Минск, 1992. – 18 с.
16. Славин У. Атомно-абсорбционная спектроскопия. – Ленинград: Химия, 1989. – 296 с.
17. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
18. Физиология и патофизиология сердца. Пер. с англ. под ред. Н. Сперелакиса. В 2-х т. Т. 1. – М.: Медицина, 1988. – 624 с.
19. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз. – М.: Наука, 1995. – 243 с.
20. Патент на винахід UA-7-G09B23/28, №43978A від 15.01.02, Держпатент України, Спосіб моделювання атеросклерозу. Ляшенко В. П., Лукашов С. М., Зорова Ж. В., Політаєва В. І.
21. Tulenko T. N., Bbrown J., Laury-Kleihop L. Atheroprotection with amlodipine: cells to lesions and the prevent trial // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – 33, № 2. – P. 17–22.

Дніпропетров. ун-т М-ва освіти і науки України

Матеріал надійшов до редакції 5.07.2003