

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ЯРМИШ Наталія Василівна

ВІПЛИВ ГІПОТЕРМІЇ НА Са - НАСОС САРКОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ТОТАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ МІОКАРДА ЩУРІВ

03.00.22 - Кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

м. Харків - 1993

AB 28.203

Робота виконана на базі проблемної лабораторії кафедри госпітальної терапії Харківського медичного інституту

Науковий керівник:

член - кореспондент АН України, професор А. М. Белоус

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, в. н. с. Г. Ф. Жегунов

доктор біологічних наук, зав. відділом А. И. Вожков

Провідна організація: Інститут біохімії ім. А. В. Паладіна
АН України (м. Київ)

Захист відбудеться 16. XI 1993 р. о 13³⁰ години на засіданні спеціалізованої ради Д 016.80.01. при Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України (312015, м. Харків, вул. Переяславська, 23).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології та кріомедицини АН України.

Автореферат розіслано " 13 " X 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,

доктор медичних наук, професор

А. Н. Гольцев

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00802606 (M)

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ. Регуляція клітинного метаболізму під впливом зовнішніх сигналів здійснюється за участю різних медіаторів, до яких відносяться й іони Ca^{2+} . Головну роль у цьому процесі відіграють системи, функція яких пов'язана зі зміною концентрації цих іонів в клітині (Ритов, 1983; Левицький, 1990).

Однією з найбільш досліджених систем активного транспорту іонів є Ca^{2+} -насос саркоплазматичного ретикулуму (СР). За умов патологічного стану (у випадках ішемії) спостерігається підвищення рівня цих іонів, що призводить до деградації структури та порушення скорочувальної функції міокарда.

Для захисту міокарду від дії факторів ішемії ефективним є використання знижених температур, що понижують споживання енергетичних ресурсів міокарда (Hess, 1981; Jennings, 1989), сприяють пригніченню протеолізу білкового компоненту Ca^{2+} -насоса СР (Kimoto, 1989), а також підвищують стійкість серця до дефіциту кисню.

Основна маса досліджень, стосовано механізмів функціонування Ca^{2+} -насосів, виконана на СР скелетних м'язів (Архипенко, 1982; Курський, 1989; Fabiato, 1983; Nelson, 1986). Стан Ca^{2+} -транспортуючої системи СР за умов ішемії міокарду досліджено значно менше (Левицький, 1981; Булгаков, 1988; Feher, 1988). Вивчення впливу гіпотермії на ішемізований міокард дало неоднозначні дані. Деякими авторами за умов глибокого охолодження виявлені порушення у функціонуванні мембран міоцитів (Бояринов, 1981), хоч дані інших дослідників продемонстрували як наслідок гіпотермії добре збереження клітинних мембран та відсутність змін Ca^{2+} залежної АТФазної активності, в умовах значного порушення здатності СР до поглинання Ca^{2+} (Віленко, 1989; Hess, 1984). Hess (1981) і Fukumoto (1987) виявили значне поглинання іонів Ca^{2+} після 60-хвилинної тотальної гіпотермічної ішемії. Гіпотермія, безумовно, позитивно впливає на пошкоджений ішемією міокард, але молекулярним механізмам її впливу на Ca^{2+} транспортуючу функцію СР у даних

патологічних умовах присвячені лише поодинокі роботи (Віленко, 1989; Булгаков, 1988; Fukumoto, 1987; Baker, 1983). Виходячи з вищесказаного, актуальним є а'ясування механізмів дії на Ca^{2+} насос СР, яке дозволяє підібрати найбільш терапевтично ефективні режими знижених температур для пролонгування початку пошкоджуючої необоротної дії ішемії на міокард. Крім того, актуальність цієї роботи зумовлюється ще й відсутністю робіт, присвячених вивченню стану Ca^{2+} насосу СР міокарду на протязі всього гіпотермічного інтервалу (від $+37^{\circ}C$ до $0^{\circ}C$) в умовах розвитку гіпоксичного синдрому, як основного триггеру тотальної ішемії органа.

Таким чином, нечисленність і неоднозначність даних літератури відносно стану структури та функції Ca^{2+} насосу СР при ішемічному пошкодженні міокарду в умовах гіпотермії визначають актуальність цього дослідження, присвяченого а'ясуванню молекулярних механізмів пошкодження серця при ішемії в умовах знижених температур.

МЕТА РОБОТИ. Метою даної роботи було визначення впливу різних режимів гіпотермії на функціональний стан Ca^{2+} насосу СР при експериментальній тотальній ішемії (автолізі) міокарду щурів.

Задачі дослідження.

1. Визначити температурну залежність пошкодження Ca^{2+} насосу СР за умов тотальної ішемії міокарда.
2. Дослідити інтенсивність процесів ПОЛ у мембранах СР при гіпотермічній ішемії міокарда (in situ та in vitro).
3. Вивчити роль процесів протеолізу у пошкодженні мембран СР при гіпотермічній ішемії міокарда (in situ та in vitro).
4. Визначити фосфоліпідний склад мембран СР за умов нормо- та гіпотермічної ішемії міокарда щурів.
5. Вивчити Ca^{2+} та кофеїн - залежне інгібування акумуляції йонів Ca везикулами СР після нормо- та гіпотермічної ішемії.

НАУКОВА НОВИЗНА. У роботі вперше здійснене дослідження аміні стану білкового і ліпідного компонентів на функцію Ca^{2+} насосу мембран СР при ішемії міокарда щурів в умовах гіпотермії різної глибини. Показано, що використання гіпотермії в інтервалі температур від $+37^{\circ}C$ до $+10^{\circ}C$ для зниження дії ішемії не впливає на рівень МДА, але зменшує рівень лізофосфатидилхоліну в мембранах серцевого СР. Вперше одержані дані

Відносно позитивної дії охолодження на Ca^{2+} - та кофеїн-залежні механізми регуляції функції Ca^{2+} -насоса СР за умов ішемії міокарда щурів.

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Теоретичне значення дослідження складається з розширення наших уявлень відносно механізмів аміни функції мембран СР в умовах пошкодження серця. Виявлено фазовий характер аміни функції Ca^{2+} -транспортуючої системи ішемізованого міокарда в умовах гіпотермії. Перша фаза аміни спостерігається в інтервалі температур від $+37^{\circ}$ до $+25^{\circ}\text{C}$ та характеризується порушенням процесу поглинання Ca^{2+} везикулами серцевого СР, інгібуванням Ca^{2+} -АТФазної активності, підвищенням вмісту вторинних продуктів ПОЛ порівняно з контрольними серцями.

Друга фаза відповідає інтервалу температур від $+25^{\circ}$ до $+5^{\circ}\text{C}$ та характеризується захисною дією на Ca^{2+} -транспортуючу та Ca^{2+} -АТФазну активності СР міокарда щурів, збереженням механізмів регуляції викиду Ca^{2+} з СР, а також інгібуванням протеолізу і фосфоліполізу.

Практична цінність одержаних результатів полягає в наукового обґрунтуванні застосування гіпотермії як протекторного засобу ефективного захисту мембран СР при тотальній ішемії міокарда щурів. Відсутність впливу гіпотермії протягом усього дослідженого інтервалу температур ($+37^{\circ}$ - $+10^{\circ}\text{C}$) на вміст вторинних продуктів ПОЛ в мембранах СР дозволяє рекомендувати поєднане застосування гіпотермії та антиоксидантів для корекції порушення функцій Ca^{2+} -насосу ішемізованого міокарда.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ВИНЕСЕНІ НА ЗАХИСТ

1. В інтервалі температур від $+37^{\circ}$ до $+25^{\circ}\text{C}$ гіпотермія уповільнює процеси, що призводять до пошкодження Ca^{2+} -транспортуючої системи мембран СР міокарда (фосфоліполіза, протеоліза, порушення Ca^{2+} - і кофеїн-залежних механізмів регуляції).
2. Гіпотермія в інтервалі температур від $+25^{\circ}$ до $+5^{\circ}\text{C}$ чинить захисну дію на Ca^{2+} -насос СР міокарда щурів у наслідок зниження рівня лізофосфоліпідів, інгібування ендпротеолізу, часткового збереження регуляційних механізмів транспорту йонів Са.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Основні положення дисертації було викладено у доповідях на Міжнародній конференції "Досягнення і перспективи розвитку кріобіології та кріомедицини" (10-12

лютого 1988 р., м. Харків) та на науковому семінарі Харківського НДІ терапії АМН України (1990 р.).

ПУБЛІКАЦІЇ. По матеріалах дисертації опубліковано 6 наукових робіт.

ОБ'ЄМ ТА СТРУКТУРА РОБОТИ. Дисертація викладена на 137 сторінках, вона містить 21 рисунок і 1 таблицю. Робота складається із "Вступу", "Огляду літератури", розділів "Матеріали і методи", "Результати досліджень", "Обговорення результатів", "Закінчення", "Висновки". Бібліографія включає 209 посилань на вітчизняні та зарубіжні праці.

ЗМІСТ РОБОТИ.

Розділ 1. Тема: " Вплив гіпотермії на Ca^{2+} - насос саркоплазматичного ретикулулу при експериментальній тотальній ішемії міокарда щурів" (огляд літератури).

Розділ 2. Матеріали та методи дослідження.

У дослідях використовувались щури - самці лінії Вістар віком 3 - 6 місяців, що утримувалися на стандартній дієті.

2.1. Моделювання пошкодження міокарда.

1. Тотальний автотліс. Щурів умертвляли цервікальним зміщенням. Серця із грудної порожнини поміщали в 0,9% розчин NaCl та піддавали інкубації протягом 1 години при $+ 37^{\circ}$, $+ 33^{\circ}$, $+ 28^{\circ}$, $+ 25^{\circ}$, $+ 20^{\circ}$, $+ 15^{\circ}$, $+ 10^{\circ}$ та $+ 5^{\circ}C$. Потім серця гомогенізували.

2.2. Виділення препаратів.

1. Одержання гомогенату сердець. Серця гомогенізували в 5 - кратному об'ємі середовища, котре містило 40 мМ трис - HCl (pH 7,4), 5 мМ азиду натрію, 100 мМ KCl, за допомогою гомогенізатора "Polytron" при температурі 0° - $+ 4^{\circ}C$. Гомогенат аразу використовували для вимірювання швидкості поглинання кальцію CP і для виділення ізольованої фракції CP.

3. Отримання фракції міросом із сердець щурів проводили за Jones et al. (1981). Всі операції одержання міросом проводили при 0° - $+ 4^{\circ}C$.

2.3. Методи вимірювання.

1. Вимірювання швидкості поглинання йонів Ca^{2+} . Швидкість поглинання Ca^{2+} вимірювали за допомогою Ca^{2+} - селективного електроду (фірма "Orion Research", кат. N 9820) у середовищі, яке містило 100 мМ KCl, 6 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 мМ NaN_3 , 10 мМ трис - HCl (pH 7.0), 15 мМ оксалату калію, 5 мМ АТФ, різні

концентрації Ca^{2+} та різні концентрації кофеїну при температурі $+37^{\circ}C$. Як АТФ - регенеруючу систему використовували 5 мМ креатинфосфат та 0.5 Од / мл креатинфосфокінази. Реакцію ініційовано додаванням 200 мкл 20% гомогенату сердець або 150 - 200 мкг білку / мл середовища.

2. Вимірювання АТФазної активності мікросом. Загальному АТФазу активність реєстрували фотометрично за ступенем накопичення ФН, який визначали за методом Фіске - Суббороу (1925). Mg^{2+} - АТФазу активність визначали у середовищі з додаванням 3 мМ ЕГТА. Активність Ca^{2+} - АТФази розраховували за різницею між загальною та Mg^{2+} - АТФазною активністю.

3. Вимірювання АТФазної активності мікросом у присутності трипсину.

Вивчали зміну АТФазної активності мікросом у середовищі, що мало той же склад, що і в п. 2.3.2., тільки з добавкою трипсину у співвідношенні 1:10 до концентрації білку мікросом. Концентрація інгібітора трипсину до концентрації трипсину складала 10:1 для зупинки реакції. Запускали реакцію додаванням 2 мМ АТФ і 100 мкг білку СР / мл середовища.

4. Визначення кількості ТБК - активних продуктів у мембранах СР міокарда за Владимировим (1972).

5. Визначення кількості фосфоліпідів у мембранах СР. Фосфоліпіди розділяли методом тонкошарової хроматографії, за Кейтсом (1979).

6. Концентрацію вільного Ca^{2+} розраховували за Fabiato, Fabiato (1979).

7. Концентрацію білку визначали модифікованим методом Лоурі (1951), як стандарт використовуючи бичачий сироватковий альбумін.

8. Статистичну обробку результатів здійснювали за методом Ст'юдента - Фішера.

2.4. Реактиви. У дослідях використані реактиви: KCl, NaCl, $CaCl_2$, сахароза, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - фірми "Anala'R" (BdH); кофеїн, NaN_3 - фірми "Sigma"; іонофор A23187 - фірми "Calbiochem"; іонообмінна смола "Chelex 100", бичачий сироватковий альбумін - фірми "Bio Rad"; трипс, ЕГТА, трипсин, соєвий інгібітор трипсину - фірми "Reanal".

Інші реактиви вітчизняного виробництва, марки ООЧ. Усі розчини готувалися на бідистильованій воді.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення температурної залежності швидкості поглинання йонів Са везикулами СР міокарда *in situ* після 60 - хвилинної нормотермічної ішемії показало трикратне зниження досліджуваної швидкості (рис.1), що продовжує зменшуватися при зниженні температури від + 33° до + 25°С порівняно з нормотермією. У випадку такого незначного охолодження можливе порушення упорядкованості ліпідів у мембрані, що, в свою чергу, може впливати на функції мембранов'язаних білків.

У температурному інтервалі + 25° - + 15°С ми спостерігали збільшення Са²⁺- транспортуючої активності везикул СР, яке виникає, очевидно, в результаті захисного ефекту гіпотермії на досліджувані мембрани.

У подальшому ми досліджували за умов знижених температур вплив основних патогенетичних процесів, які активізуються при ішемії, на Са²⁺- транспортуючу функцію мембран СР міокарда щурів.

Одним із провідних патогенетичних процесів при ішемії є ендопротеоліз. В експериментах *in vitro* на везикулах СР із контрольних сердець в присутності трипсину показано, що інкубація мікросом при + 37°С призводить до значного зниження Са²⁺- АТФазної активності. У випадку зменшення температури інкубації до + 28°С спостерігається зниження активності основного ферменту СР в порівнянні з контрольними значеннями. При температурах інкубації нижче + 28°С Са²⁺- АТФазна активність знову підвищується, а при + 20°С вірогідно не відрізняється від контролю.

В умовах *in situ* виявляється подібна температурна залежність активності Са, Mg²⁺- АТФазн (рис.2). Зниження Са²⁺- АТФазної активності при нормотермічній ішемії, на нашу думку, пов'язано з активацією протеолітичних ферментів у даних експериментальних умовах. Можна припустити, що зміна активності Са, Mg²⁺- АТФазн СР пов'язана зі зміною ліпідного компоненту мембран через те, що цей фермент має чутливість навіть до незначних змін мікрор'язкості ліпідного подвійного шару. Існує критичне значення в'язкості, при якому цей параметр починає лімітувати активність Са, Mg²⁺- АТФазн мембран СР, що може пояснити, принаймі частково, зниження Са²⁺- АТФазної активності при температурах ішемії від + 33° до + 25°С. Зниження

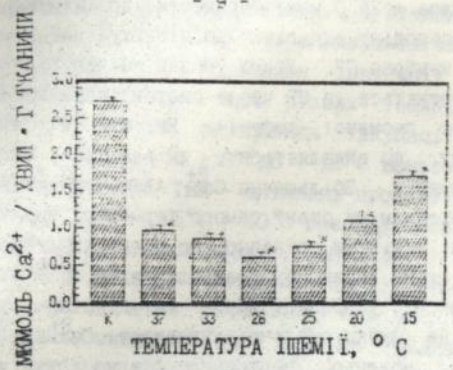


Рис. 1. Залежність швидкості поглинання іонів Ca серцевим саркоплазматичним ретикуломом від температури ішемії

К - контроль

* - $p < 0.05$ по відношенню до контролю.

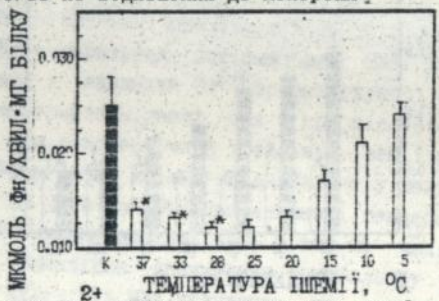


Рис. 2. Залежність Ca - АТФазної активності мембран саркоплазматичного ретикулуму сердець щурів від температури ішемії

К - контроль

* - $p < 0.05$ по відношенню до контролю

температури нижче + 25°C може привести до кластеризації та латерального розподілу ліпідів, що підвищує пасивну вибіркиму проникливість мембран СР. У цих умовах збільшується витікання Ca^{2+} що транспортується із СР через систему пасивного транспорту за допомогою пасивної дифузії. Витікаючий Ca^{2+} реактивує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$, що виявляється, як здається, в підвищенні активності ферменту. Збільшення $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ активності може відбуватися через зміну стану самого ферменту, числа його активних молекул, оскільки показано, що зменшення температури приводить до зміни характеру розщеплення $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ СР.

Таким чином, у процесі нормо- та гіпотермічної ішемії проходить зміна функціональної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$, яка обумовлена, можливо, порушенням фізико-хімічних властивостей ліпідів мембран СР міокарда, зміною активності самих протеолітичних ферментів або порушенням стану чи доступу ферменту для ендопротеази.

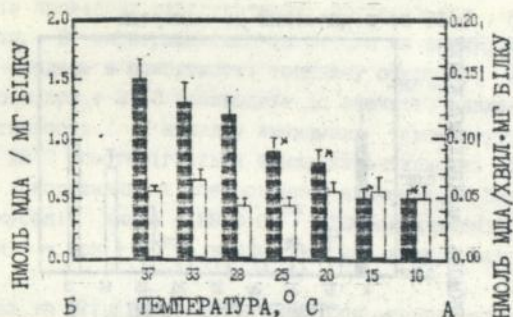




Рис. 3. Вміст і швидкість накопичення МДА в мембранах саркоплазматичного ретикулуму із сердець щурів за умов різних температур ішемії та інкубації *in vitro* по осі абсцис: А - температура інкубації, °C
 Б - температура ішемії, °C
 по осі ординат: А - швидкість накопичення МДА, нмоль / хвиль · мг білку
 Б - вміст МДА, нмоль МДА / мг білку
 А -  ; Б - 

* - $p < 0.05$ по відношенню до рівня при ішемії + 37 °C

У регуляції метаболізму ліпідів біомембран важлива роль належить процесам ПОЛ. У наших експериментах мембрани СР із контрольних сердець піддавалися інкубації з прооксидантною системою Fe^{2+} аскорбат при різних температурах (рис. 3А). Зниження температури середовища інкубації мембран СР із контрольних сердець від $+37^{\circ}$ до $+10^{\circ}C$ призводить до пониження швидкості накопичення ТЕК - активних продуктів. При температурах інкубації вище $+15^{\circ}$ - $+20^{\circ}C$ реєструється більша швидкість накопичення МДА, що пов'язано, можливо, зі зміною фізичного стану ліпідного бішару. Очевидно, що при ішемії серця за умов гіпотермії накопичення перекисних продуктів у мембранах СР будуть не таким значним, як у випадку нормотермічної ішемії. Дійсно, інкубація контрольних СР при температурі нижче $+37^{\circ}C$ продемонструвала зниження швидкості накопичення МДА, що, на нашу думку, мусило б корелювати з підвищенням швидкості транспорту везикул СР при гіпотермічних температурах (рис. 1; 3А).

Подальші наші експерименти показали, що кількість ендогенних ТЕК - активних продуктів в СР із сердець, ішемізованих при різних температурах, подібна (рис. 3Б). ПОЛ, явно, дає певний внесок у зниження Ca^{2+} транспортуючої активності СР не тільки при нормотермічному, але й при гіпотермічному автолізі. Можливо, при гіпотермічній тотальній ішемії серця створюються умови, за яких може виникнути дисбаланс у швидкостях клітинних реакцій. За умов *in situ* при зниженні температури зменшується активність антиоксидантної та, в той же час, прооксидантної системи. Внаслідок виникнення дисбалансу між цими двома системами кількість МДА практично не відрізняється за показниками при всіх вивчених температурах.

Таким чином, захисна дія гіпотермії за умов ішемії на Ca^{2+} - насос СР міокарда шурів викликана не зміною кількості вторинних продуктів ПОЛ, а інгібуванням деяких інших патогенетичних процесів.

Фосфоліпіди, масові зміни яких спостерігаються при ішемії, відносяться до основних структурних компонентів біологічних мембран.

Нормотермічна ішемія (при $+37^{\circ}C$) призводить до збільшення кількості лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) в мембранах СР більш, ніж в 1,7 разів (кількість дано в % від сумарного вмісту

фосфоліпідів). Це може бути викликано активацією фосфоліпаз або процесів ПОЛ. Вміст ЛФХ в мембранах СР після гіпотермічної ішемії знижується порівняно з нормотермічною ішемією. Подібне зниження кількості ЛФХ порівняно з кількістю його в мембранах СР із нормотермічно ішемізованого серця може бути пов'язане з уповільненням процесу фосфоліполізу при гіпотермічних температурах порівняно з нормотермічною ішемією (+37 °С). Дані відносно накопичення лізоформ знаходяться у прямих стосунках зі зниженням Ca^{2+} транспортуючої функції СР (рис.1).

Після нормотермічної ішемії (+ 37 °С) відбувається збільшення кількості фосфатидилінозиту (ФІ) в мембранах СР порівняно з контролем. Очевидно, це пов'язане зі зниженням активності ФІ - фосфоліпази С в умовах ішемії, що було відмічено Schwertz (1987). При зниженні температури ішемії спостерігається тенденція до зменшення вмісту даного фосфоліпиду, який досягає при +15°С приблизно 50 % від кількості ФІ при нормотермічній ішемії. Можливо, при охолодженні посилюється розпад даного фосфоліпиду, необхідного для створення цитоплазматичних інозитол - три - та діфосфатів.

Що стосується решти фракцій фосфоліпідів мембран СР, слід відзначити зниження кількості фосфатидилхоліну (ФХ) та збільшення кількості фосфатидилетаноламіну (ФЕА) порівняно з аналогічними фракціями в мембранах контрольного СР після, годинно: нормотермічної ішемії. У мембранах СР здійснюється оборотний процес перетворення ФЕА в ФХ. Зміщення рівноваги в бік зворотної реакції призводить до інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ - АТФаз СР. Даний процес можна розглядати також як один із факторів, знижувальних Ca^{2+} транспортуючу активність ферменту. При охолодженні спостерігається та ж тенденція, проте збільшення вмісту ФЕА і зменшення ФХ менше, ніж у випадку нормотермічної ішемії.

Усі відмічені нами процеси, а саме: ПОЛ, накопичення ЛФХ, зміна фосфоліпідного складу - можуть призвести до зміни ліпідного компоненту мембран та до підвищення її пасивної проникливості. Наслідком цього вважається порушення функції Ca^{2+} - насоса везикул СР міокарду. Краще збереження Ca^{2+} транспортуючої активності мембран СР спостерігається при температурах нижче + 25° - + 20°С, очевидно, внаслідок гальмування ендпротеолізу та фосфоліполізу.

Порушення функціональної активності Ca^{2+} -насосу при ішемії міокарда виникає не тільки через зміну структурної суцільності мембран в результаті активації основних патогенетичних процесів, але й внаслідок порушення механізмів регуляції Ca^{2+} транспортуючої системи.

Ми вивчали роботу Ca^{2+} -насосу в гомогенаті із нормо- і гіпотермічних сердець при 15 мкМ вільного Ca^{2+} концентрації близької до такої в ішемізованому міокарді, та при 1,5 мкМ в середовищі вимірювання, що відповідає оптимальній концентрації для роботи Ca^{2+} -насосу. В гомогенаті ішемізованих сердець при зниженні концентрації зовнішнього Ca^{2+} від 15 до 1,5 мкМ виникає активація швидкості поглинання іонів Ca приблизно на 17 %, що менше, ніж у контрольній групі, в якій Ca^{2+} транспортуюча активність підвищується в 2,5 рази. В гіпотермічних умовах зі зменшенням концентрації зовнішніх іонів Ca від 15 до 1,5 мкМ активація поглинання Ca^{2+} CP приблизно на 40 % більша, ніж після гіпотермічної ішемії ($p < 0,05$). Очевидно, отримані результати обумовлені захисною дією охолодження на Ca^{2+} -регуляцію транспорту йонів везикулами CP. Можна припустити, що стимуляція Ca^{2+} -насосу CP концентрацією Ca^{2+} , що виникає пова везикулами, фізіологічно передбачена та необхідна для функціонування цього процесу за умов концентрації Ca^{2+} , яка постійно змінюється. Порушення скорочування серця при ішемії може бути зумовлене, щонайменше частково, відміченими нами порушеннями Ca^{2+} залежної регуляції транспорту Ca^{2+} .

Для підтвердження цього припущення нами були проведені дослідження впливу другого агенту, що викликає активацію Ca^{2+} -каналів, - кофеїну, на швидкість поглинання йонів Ca в нормо- та гіпотермічних серцях. При концентрації йонів Ca в середовищі вимірювання 1,5 мкМ концентрація кофеїну (1 мМ) в наших умовах приводить до максимального інгібування швидкості поглинання Ca^{2+} (рис. 4). В контрольній та гіпотермічно ішемізованій групах ця концентрація кофеїну знижує швидкість транспорту йонів Ca приблизно на 45 %. При нормотермічній ішемії (+ 37°C) спостерігається зменшення швидкості поглинання Ca^{2+} викликаного кофеїном, майже на 60 %. При значно нижчих концентраціях кофеїну (1 мкМ) транспорт Ca в CP пригнічується в усіх 3 групах. Однак і тут величина інгібування в гомогенатах із контрольних та гіпотермічно ішемізованих сердець на 10 -

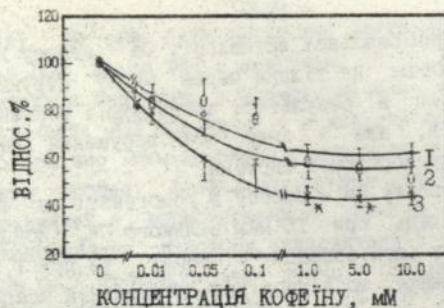


Рис. 4. Залежність швидкості поглинання іонів Ca саркоплазматичним ретикулумом при концентрації Ca²⁺ 1,5 мкМ від концентрації кофеїну

1 - К - контроль; 2 - + 5°C; 3 - + 37°C

* - p < 0.05 по відношенню до контролю



Рис. 5. Залежність швидкості поглинання іонів Ca саркоплазматичним ретикулумом при концентрації Ca²⁺ 15 мкМ від концентрації кофеїну

1 - К - контроль; 2 - + 5°C; 3 - + 37°C

* - p < 0.05 по відношенню до контролю

15 % менше, ніж інгібування після нормотермічної ішемії. Дані, отримані нами, вказують на те, що для максимального пригнічування поглинання йонів Ca^{2+} із автолізованого серця ($+ 37^\circ\text{C}$) потрібна менша концентрація кофеїну, ніж для подібного процесу в Ca^{2+} контрольних сердець. Очевидно, що в ішемізованому міокарді порушені механізми регуляції викиду Ca^{2+} чи, можливо, Ca^{2+} - транспортуюча система Ca^{2+} після нормотермічної ішемії більш чутлива до дії кофеїну.

При більших концентраціях Ca^{2+} (рис. 5) спостерігається подібна залежність швидкості поглинання йонів Ca^{2+} від концентрації кофеїну, проте, ефект кофеїну має тенденцію до зниження, особливо порівняно з відповідними швидкостями транспорту Ca^{2+} , вимірними у гомогенаті при малих концентраціях Ca^{2+} та ішемізованих при $+ 37^\circ\text{C}$ серцях (рис. 4, 5; криві "3"). Порівняння залежності транспорту Ca^{2+} везикулами Ca^{2+} Ca^{2+} серdecь, підданих гіпотермічної ішемії ($+ 5^\circ\text{C}$), від різних концентрацій Ca^{2+} дозволяє відзначити, що при всіх концентраціях кофеїну не спостерігається статистично вірогідної відміни (рис. 4, 5; криві "2").

Таким чином, механізм викиду Ca^{2+} із Ca^{2+} автолізованого серця більш чутливий, ніж із Ca^{2+} контрольного серця, до зовнішньої концентрації йонів Ca^{2+} та до невеликих концентрацій кофеїну, що призводить до зміни функціональних характеристик Ca^{2+} - транспортуючої активності, а також до збільшення чутливості по відношенню до будь - якого впливу, що викликає викид йонів Ca^{2+} із цистерн Ca^{2+} Ca^{2+} міокарда шурів. Глибока гіпотермія ($+ 5^\circ\text{C}$) дозволяє частково застерегти цих порушень.

Таким чином, протекторна дія гіпотермії на функцію Ca^{2+} - транспортуючої системи Ca^{2+} кардіоміоцитів за умов тотальної ішемії здійснюється внаслідок гальмування ендопролеолізу, фосфоліполізу та в результаті часткового запобігання порушення регуляторних механізмів функціонування Ca^{2+} - насосу зазначених мембран.

ВИСНОВКИ

1. Протекторна дія гіпотермії на Ca^{2+} - насос Ca^{2+} Ca^{2+} при тотальній ішемії міокарда здійснюється шляхом інгібування процесів ендопролеолізу та фосфоліполізу і позитивного впливу на регуляційні Ca^{2+} - і кофеїн - залежні механізми.
2. Виявлено фазовий характер змін Ca^{2+} - транспортуючої

системі ішемізованого міокарда в умовах гіпотермії.

3. При гіпотермії в інтервалі температур від + 37° до + 25° С виявлено гальмування процесу поглинання йонів Са везикулами СР міокарда, інгібування Са²⁺ АТФазної активності, підвищення вмісту вторинних продуктів ПОЛ.

4. Гіпотермія в інтервалі температур від + 25° до + 5° С чинить захисну дію на Са²⁺ - транспортуючу активність СР міокарда щурів за рахунок інгібування процесів пролеолізу і фосфоліполізу та спричиняє стабілізуючий ефект на Са²⁺ - та кофеїн - залежні механізми регуляції Са²⁺ - насосу ретикулярних мембран.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бровкович В. М., Ярьмиш Н. В. Исследование механизмов защитного действия гипотермии на Са²⁺- насос саркоплазматического ретикулума при автолизе миокарда. - Укр. биохим. журн. - 1989. - N 6. - С. 58 - 61.
2. Бровкович В. М., Ярьмиш Н. В. Перекисное окисление липидов при гипотермической защите мембран саркоплазматического ретикулума ишемизированного миокарда. - Криобиология. - 1990. - N 1. - С. 21 - 24.
3. Малая Л. Т., Бровкович В. М., Ярьмиш Н. В. Влияние кофеина и Са²⁺ на Са²⁺- транспортирующую активность саркоплазматического ретикулума в гомогенате из нормо- и гипотермически ишемизированных сердец крыс. - Криобиология. - 1991. - N 1. - С. 18 - 23.
4. Малая Л. Т., Белоус А. М., Ярьмиш Н. В., Бровкович В. М. Исследование структуры и функции Са²⁺-насоса саркоплазматического ретикулума при гипотермической ишемии миокарда крыс. - Докл. АН Украины. - 1992. - февр. - N. 2. - С. 144 - 147.
5. Малая Л. Т., Бровкович В. М., Лагарева С. А., Бахова Л. К., Ярьмиш Н. В. Гипотермическая защита мембран ишемизированного миокарда. - Тез. докл. международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины". - Харьков, 1988. - С. 111 - 112.
6. Ярьмиш Н. В., Бровкович В. М. Механизмы защитного действия гипотермии на Са²⁺- насос саркоплазматического ретикулума при экспериментальной ишемии миокарда крыс. - Тез. докл. 2-ой международной конференции "Успехи современной криобиологии". - Харьков, 1992. - С. 210.

Підписано до друку 6.ІО.93 р. формат 60x84 1/16, папір
для розмножувальних апаратів, друк офсетний, ротапінт,
ХОУС, зам. 1572, тир. 100 прим.

UCM352

Ab 28.203

AB 28.203