

Інститут геронтології АМН України.

На правах рукопису.

Горбань Олена Миколаївна.

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ФОСФОЛІПІДНОГО СКЛАДУ І АКТИВНОСТІ
Na,K-АТФАЗИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН МІОКАРДІОЦИТІВ В УМОВАХ
БЛОКАДИ АДРЕНЕРГІЧНИХ ВПЛИВІВ І ДІЇ ІНСУЛІНУ.

03.00.04 - Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1994 р.

„ 1990



Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті геронтології АМН України

Наукові керівники:

доктор медичних наук,
академік АН і АМН України
професор

Фролькіс Володимир Веніамінович

доктор медичних наук
Кульчицький Олег Костянтинович

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук,
член-кореспондент АН України,
професор

Гулая Надія Максимівна

доктор медичних наук
Мхітарян Лаура Сократівна

Провідна організація

Університет ім. Т. Г. Шевченка

Захист відбудеться "3" березня 1994 року на засіданні спеціалізованої ради Д 001.28.01 при Інституті геронтології АМН України : 254114, Київ-114, вул. Вишгородська, 67.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту геронтології АМН України.

Автореферат розісланий " _____ " _____ 1994 року,

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Потапенко Р. І.

Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. В сучасній геронтології накопичена значна кількість фактів, які свідчать, що в механізмах старіння суттєву роль відіграють пов'язані з віком зміни нейрогуморальної регуляції /Фролькис В. В., 1970-1992/, які визначають адаптаційно-приспосувальні можливості організму. Важливим компонентом механізму нейрогуморальної регуляції є здатність тканини сприймати інформацію, яка до неї надходить. Структурним елементом клітини, на якому розташовані білкові утворення, що сприймають інформацію, яка надходить, є її плазматична мембрана (ПМ). Вона уявляє собою складний морфо-функціональний комплекс, який містить рецептори, ферментні ансамблі, іонні канали та ін. Функціональна активність всіх цих компонентів ПМ багато в чому обумовлюється їх ліпідним оточенням у мембрані /Бергельсон Л. Д., 1982; Болдырев А. А., 1986/.

Основним мембраног'язаним комплексом, який забезпечує активний транспорт іонів Na^+ і K^+ через ПМ приймає участь у механізмах підтримання мембранного потенціалу, є $Na, K-ATPase$. Активність цього ферменту в значній мірі обумовлена властивостями ліпідного матриксу ПМ /Tanaka, 1974; Lucy, 1974; Милютин А. А., 1992/. Є дані як про зміни фосфоліпідного (ФЛ) складу ПМ при старінні /Кульчицкий О. К., 1989/, так і про зміни активності $Na, K-ATPase$ /Богачкая Л. Н., Потапенко Р. И., 1987; Hennesy, 1988/. Висловлено припущення, що зміни ФЛ складу ПМ можуть визначати порушення нейрогуморальної регуляції різних органів і тканин при старінні (Фролькис В. В., 1989). Згідно сучасним уявленням зміни нейрогуморальної регуляції функцій серцево-судинної системи лежать в основі розвитку її патології в старості /Коркушко О. В., 1983; Fleg, 1986; Токарь А. В., 1982, Фролькис В. В., 1990/.

Важливу роль в регуляції функцій серцево-судинної системи має адренергічна регуляція. Реалізація адренергічних впливів на міокард в значній мірі обумовлена властивостями ПМ міокардіоцитів /Zitnik, Roth, 1931, Abrass et al. 1982/. Разом

в тим, до теперешнього часу відсутні комплексні дослідження вікових особливостей адренергічних впливів на ФЛ склад ПМ міокардіоцитів, на функції мембрано-зв'язаних білкових комплексів, зокрема, активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів.

Одним з можливих шляхів вивчення особливостей адренергічних впливів є використання специфічних блокаторів адренорецепторів. Бета-адренорецептори розташовані, переважно в міокарді, а альфа-адренорецептори - переважно у судинах. По ступеню змін ФЛ складу і активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів при блокаді бета та альфа-адренорецепторів, можна судити про характер вікових зрушень в механізмах адренергічної регуляції функцій міокарду.

✓ Суттєву роль в механізмах регуляції серцево-судинної системи відіграють впливи інсуліну / Фролькіс В. В., Беаруков В. В., Шевчук В. Г., 1984/. Важливим є і те, що ефекти, зумовлені інсуліном, визивають зрушення подібні до холінергічних, парасимпатичних впливів на серце.

Разом з тим, при старінні змінюються як концентрація інсуліну в крові та його біологічні властивості, так і стан ПМ клітин /Фролькіс В. В., Богацкая Л. Н., Кульчицкий О. К., 1982/.

В останні роки в Інституті геронтології під керівництвом В. В. Фролькіса були виконані роботи, які довели існування взаємозв'язку між інтенсивністю синтезу білка і змінами стану ПМ при дії факторів, що активують синтез білка у клітині, зокрема, інсуліну. На цій підставі була висунута гіпотеза про існування нового класу внутрішньоклітинних регуляторних факторів пептидної природи - інверторів, які контролює геном, і які здійснюють вплив на стан ПМ /Frolkis V. V., 1992/.

В той же час пов'язані з віком особливості впливу інсуліну на стан міокардіоцитів, зокрема на ФЛ склад і активність Na, K-АТФази до теперешнього часу не вивчені.

Мета і задачі дослідження

Метою роботи було вивчення пов'язаних з віком особливостей ФЛ складу і активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів, а також їх можливих змін при блокаді адренергічних впливів

бета-адреноблокатором обзіданом і альфа-адреноблокатором дібенаміном, а також під впливом інсуліну.

У відповідності до поставленої мети були визначені завдання досліджень:

- 1). Вивчити особливості ФЛ складу і активності Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів у дорослих і старих щурів.
- 2). Вивчити вікові особливості змін ФЛ складу і активності Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів при хронічному введенні бета- або альфа-адреноблокаторів.
- 3). Вивчити вікові особливості впливу інсуліну на ФЛ склад і активність Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів.
- 4). Вивчити вікові особливості впливу нейрогуморальних факторів на взаємозв'язок між ФЛ-складом ПМ і активністю Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів на фоні блокування білоксинтетичних процесів за допомогою актиноміцина Д.

Наукова новизна роботи полягає в тому, що вперше одержано дані про вікові особливості взаємозв'язку між змінами ФЛ складу ПМ міокардіоцитів і активністю Na, K-ATФази.

Вперше досліджені вікові особливості впливу хронічного введення бета і альфа-адреноблокаторів та інсуліну на ФЛ склад ПМ і активність Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів.

На основі одержаних даних вперше встановлено, що під впливом інсуліну у цитозолі міокардіоцитів і в сироватці крові щурів синтезується фактор, який активує Na, K-ATФазу міокардіоцитів, і це може відігравати суттєву роль в змінах системи нейрогуморальної регуляції функцій серця при старінні.

Теоретичне значення роботи. Одержані дані сприяють розкриттю нових особливостей нейрогуморальної регуляції функціональної активності міокарду при старінні, які обумовлені змінами стану міокардіоцитів і білоксинтетичних процесів у міокарді, розширюють уявлення про роль мембрано-геномних механізмів в дії гормонів, висвітлюють віковий аспект цієї проблеми.

Практичне значення роботи. Одержані дані необхідно враховувати для оцінки ефективності препаратів, які змінюють трансмембранну передачу нейрогуморальних впливів у осіб похилого та старечого віку, а також для обґрунтування використання інсуліну у гериатричній кардіологічній практиці.

Апробація роботи. Апробація дисертації проведена на засіданні відділу біології старіння Інституту геронтології АМН України. Основні положення роботи докладались на конференціях молодих вчених /Київ, 1990, 1991/, та на засіданні відділу біології старіння Інституту геронтології АМН України.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 5 наукових праць.

Об'єми і структура роботи. Дисертація виконана на 126 сторінках машинописного тексту, включаючи 10 таблиць та 11 малюнків.

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису об'єктів та методів дослідження, результатів власних досліджень, обговорювання даних, висновків і списку використаної літератури.

Матеріали та методи дослідження.

Експерименти проведені на дорослих (6-8 міс.) і старих (26-28 міс.) щурах-самцях лінії Вістар. Усього використано в дослідах 415 тварин.

Об'єдан (НДР) або дібенамін (Serva, ФРН) вводили внутрішньочеревинно із розрахунку по 10 мг на 1 кг маси тіла тварини два рази на добу на протязі 3 днів. Інкубацію фракцій ізольованих ПМ і гомогенату міокардіоцитів з об'єданом здійснювали в середовищі, яке містило 10 мкг/мг білку препарату.

Інсулін (виробництва Львівського м'ясокомбінату) вводили внутрішньочеревинно на фізіологічному розчині із розрахунку 1,6 Од на 1 кг маси тіла тварини за 40 хвилин до депітації. У дослідах з використанням актиноміцину Д, блокатор синтезу білка вводили у розрахунку 50 мкг на 1 кг маси тіла тварини за 30 хвилин до введення інсуліну.

Контрольним тваринам вводили внутрішньочеревинно фізіологічний розчин.

ПМ серця виділяли по методу Сааонтової Т. Г. (1986). Інкубацію фракції ізольованих ПМ міокардіоцитів з цитозолем міокардіоцитів і сироваткою крові щурів проводили в середовищі, яке містило 150 мкл цитозоля міокардіоцитів або сиро-

ватки крові.

Вміст білка визначали за методом Bradford (1976).

Про ступень очищення препаратів ізольованих ПМ судили по збагаченню її у порівнянні з гомогенатом маркерним ферментом ПМ - 5' нуклеотидазою /Michell ,Hamthorn ,1965/.

Екстракцію загальних ФЛ із суспензії ПМ здійснювали хлороформ-метанольною сумішшю (1:2) за методом Фолча у модифікації Кейтс М.(1975). Аліквоти хлороформних екстрактів концентрували упарюванням у струмені азоту. Вміст загального холестерину (ХС) в екстракті ліпідів визначали за допомогою кольорової реакції /Searey, Bergguist, 1960/, загальних ФЛ визначали по неорганічному фосфору, після "мокрого" спалювання у перхлорній кислоті /Svebord ,Svennerholm ,1961/.

Розділення ФЛ на фракції здійснювали за допомогою двомірної мікротонкошарової хроматографії /Svetashev,Vaskovsky ,1972/ на основі сілікагелю "КСК" 2/40. Вихідне хроматографування проводили в системі розчинників у першому напрямку сумішшю хлороформ-метанол-концентрований аміак (65:35:5) і, після 30 хвилин сушіння, у другому напрямку сумішшю хлороформ-ацетон-метанол-оцтова кислота-вода (30:40:10:10:5). Виявлення плям фракцій ФЛ проводили за допомогою обприскування пластинок 10% сірчаною кислотою у метанолі і спалювання при 200 С.

Ідентифікацію фракцій ФЛ здійснювали за допомогою специфічних кольорових реакцій і по розташуванню на хроматограмах "свідків" - індивідуальних ФЛ /Збарский В. А., 1979/. Кількісне визначення вмісту ФЛ у плямі здійснювали за методом Vaskovsky,Kostesky,Vasendin (1975).

Про активність Na,K-АТФази судили по різниці між загальною і магнієвою АТФазною активностями. АТФазну активність вимірювали по накопиченню у реакційній суміші неорганічного фосфату /Поталенко Р. И., 1988/.

Концентрацію неорганічного фосфату визначали за методом Ratburn, Betlach (1969).

Статистична обробка результатів досліджень проведена з використанням t критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення.

✓ Проведені дослідження свідчать, що в старості знижується рівень фосфатиділінозиту (ФІ) ($12,5 \pm 0,8$ % у дорослих, $6,3 \pm 0,8$ % у старих тварин, $p < 0,05$) та підвищується рівень кардіоліпіну (КЛ) ($9,2 \pm 0,8$ % у дорослих, $14,2 \pm 1,8$ % у старих тварин, $p < 0,05$).

Поряд з цим, було встановлено, що у старих тварин відбувається зниження активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів ($12,39 \pm 1,4$ ммоль Рі/мг білка за годину у дорослих тварин, $6,33 \pm 0,58$ ммоль Рі/мг білка за годину у старих, $p < 0,05$).

✓ Відомо, що Na, K-АТФаза виявляє максимальну активність лише будучи зв'язаною з негативно зарядженими ФЛ - фосфотиділсеріном (ФС) та ФІ. / De Pont et al, 1978, Roelofsen et al., 1981/ Тому можна припустити, що однією з причин зниження активності Na, K-АТФази може бути різке падіння рівня ФІ у ПМ міокардіоцитів старих тварин.

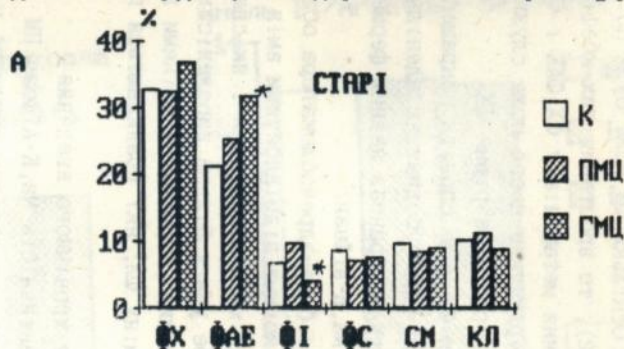
На наступному етапі досліджень нами були вивчені зміни ФЛ складу і активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів в умовах хронічної блокади бета-адренореактивних структур.

Триденне введення обідану спричиняло до суттєвих змін ФЛ спектру ПМ міокардіоцитів як у старих, так і у дорослих тварин (Мел. 1, В). Так, у дорослих тварин відмічалася зниження в ПМ міокардіоцитів вмісту фосфатиділхоліну (ФХ) і фосфатиділсеріну (ФС), та зростання вмісту сфингомієліну (СМ) і КЛ. У старих тварин, на відміну від дорослих хронічне введення бета-адреноблокатора призводило до підвищення рівней ФХ, СМ і зниження рівней ФС, ФІ та фосфатиділетаноламіну (ФАЕ).

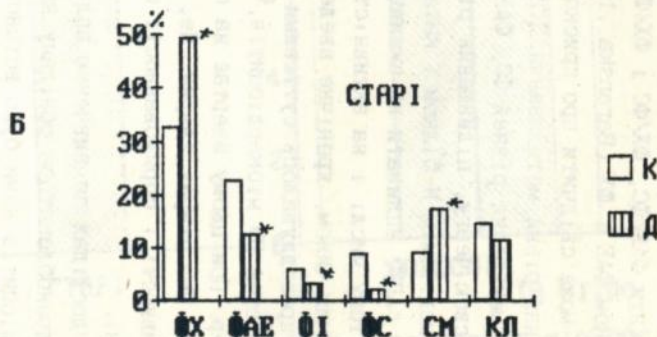
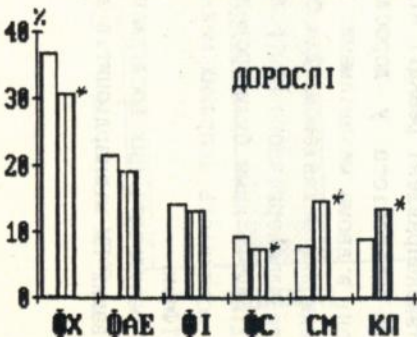
У дорослих тварин введення обідану викликало збільшення співвідношення СМ/ФХ в 2,5 рази (контроль- $0,2 \pm 0,05$, дослід- $0,5 \pm 0,02$; $p < 0,05$), а у старих призводило до підвищення співвідношень ФХ/(ФАЕ + ФС + ФІ) в 3 рази (контроль- $0,86 \pm 0,04$, дослід- $2,6 \pm 0,06$, $p < 0,05$), ФАЕ/ФС в 2 рази (контроль- $2,5 \pm 0,6$, дослід- $5,12 \pm 0,4$, $p < 0,05$) ФХ/ФС в 5,5 разів (контроль- $3,6 \pm 0,4$, дослід- $19,8 \pm 0,8$, $p < 0,05$) і ФХ/ФАЕ в 2,7 разів (контроль- $1,4 \pm 0,2$, дослід- $3,9 \pm 0,2$, $p < 0,05$).

Звертає увагу той факт, що зміни, викликані введенням обідану, у дорослих тварин не призводили до зрушень співвід-

Вплив обзідану на фосfolіпідний склад ПМ ніокардіоцитів дорослих і старих щурів



□ К
 ▨ ПМЦ
 ▩ ГМЦ



□ К
 ▨ ПМЦ
 ▩ Д

Мал. 1. А - дослід *in vitro*; Б - дослід *in vivo*; К - контроль; ГМЦ - інкубація обзідану з гомогенатом ніокардіоцитів; ПМЦ - інкубація обзідану з плазматичними мембранами ніокардіоцитів; Д - дослід. * - $p < 0.05$.

ношень між ліпідами, які локалізовані на зовнішній поверхні ПМ, по відношенню до ФЛ, які локалізовані на внутрішній поверхні ПМ. Тоді як у старих щурів підвищувався коефіцієнт $\Phi X / (\Phi AE + \Phi C + \Phi I)$. Подібна асиметрія розподілу ФЛ може сприяти збільшенню мікрров'язкості ФЛ матрикса ПМ.

Цікавим є й те, що у старих тварин значно підвищувалися коефіцієнти $\Phi AE / \Phi C$, $\Phi X / \Phi C$ і $\Phi X / \Phi AE$. Оскільки ΦC може бути попередником ΦAE і ΦX (Baranska, 1982), то зростання цих коефіцієнтів може свідчити про прискорення метаболізму ΦX , ΦAE і ΦC , підвищення рівня метилювання. Підтвердженням цього може служити значне зменшення рівней ΦC , ΦAE і зростання рівня ΦX .

У свою чергу, підвищення рівня ΦX може сприяти покращенню взаємодії між N-білком і каталітичною субодиницею аденилатциклази (АЦ), впливати на активність мембранов'язаних ферментів, у тому числі і на активність Na, K-АТФази.

Таким чином, хронічне введення бета-адреноблокатора об'єдана супроводжувалось суттєвими віковими відмінностями амін властивостей ПМ міокардіоцитів, які мали кількісний і якісний характер. При цьому звертає на себе увагу більша вираженість змін в ПМ старих тварин. Це, можливо, обумовлене амінами в інтенсивності і спрямованості обміну ФЛ, які розвиваються при старінні.

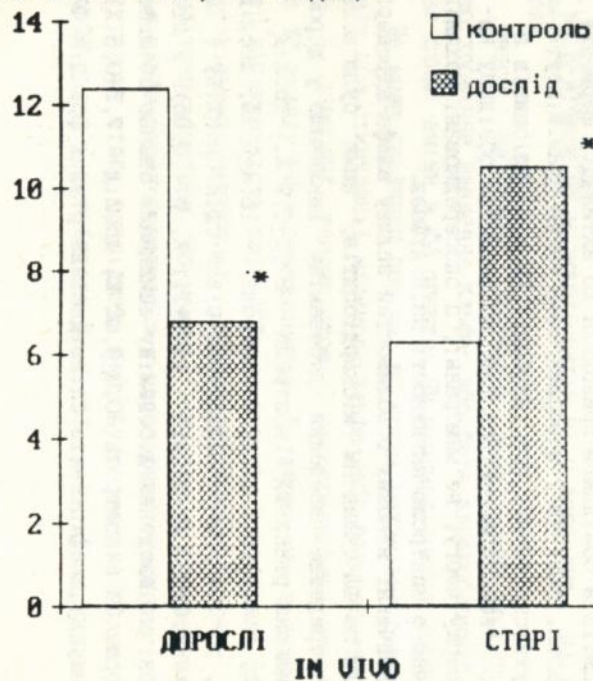
В дослідях по вивченню впливу хронічного введення бета-адреноблокатора об'єдану на активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів нами було встановлено, що об'єдан викликає у дорослих тварин - зниження, а у старих підвищення активності ферменту (Мал. 2).

Різонаправлені реакції відповіді Na, K-АТФази на введення бета-антагоніста у дорослих і старих тварин, можливо, пов'язані з двома механізмами: мембранотропним (прямим) та опосередковим механізмом. Для більш повного вивчення механізмів бета-адренергічного контролю активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів нами були проведені досліді *in vitro*, які виключали можливість непрямих механізмів регуляції активності Na, K-АТФази.

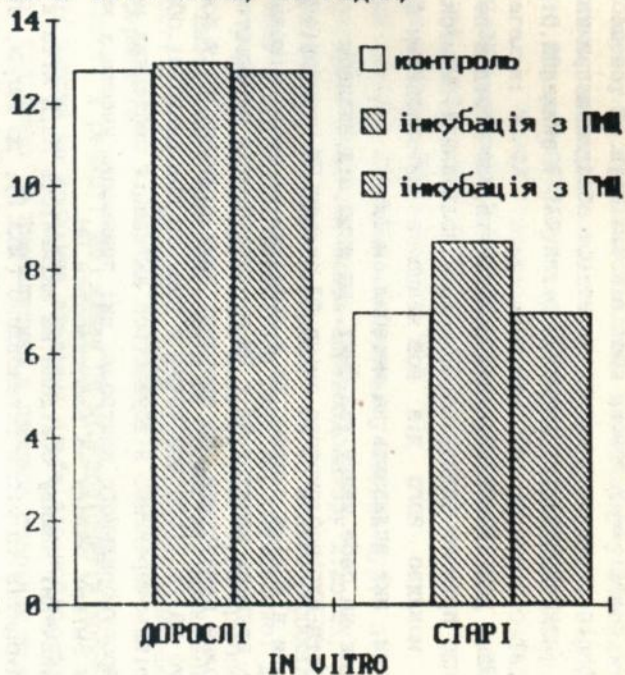
В результаті цих досліджень було доведено, що інкубація ізольованих ПМ міокардіоцитів з об'єданом не викликала змін у

Вплив обзідану на активність $\text{Na, K-ATP}\phi$ ази ПМ міокардіоцитів щурів різного віку

нмоль P_i /мг білку за годину



нмоль P_i /мг білку за годину



Мал.2. ПМЦ - плазматичні мембрани міокардіоцитів, ГМЦ - гомогенат міокардіоцитів. * - $p < 0,05$.

амісті ХС і складі ФЛ у тварин обох вікових груп. В той же час, інкубація гомогенату міокардіоцитів з обзіданом при тих же умовах приводила до підвищення рівня ФАЕ і зниження рівня ФІ (Мал. 1, А).

Одержані дані дають підставу припустити, що обзідан не спричиняє до прямого впливу на ФЛ склад ізольованих ПМ міокардіоцитів і, можливо його дія пов'язана з цитозольними факторами клітини, які впливають на метаболізм ФЛ.

Звертає на себе увагу той факт, що якщо під впливом введення бета-адреноблокатора зміни ФЛ складу ПМ міокардіоцитів залежали від віку тварин, то у дослідях *in vitro* вікова залежність зрушень спектру ФЛ у ПМ міокардіоцитів не спостерігалась. Можна припустити, що одержані нами відмінності у дослідях *in vivo* та *in vitro* пов'язані з тим, що при введенні обзідану внутрішньочеревинно відбувається активація системних механізмів нейрогуморального контролю, які приймають участь у модифікаційних змінах складу та властивостей ПМ.

При вивченні впливу обзідана на активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів *in vitro* встановлено (Мал. 2), що також, як і спектр ФЛ, активність ферменту не змінювалась в препаратах ПМ обох вікових груп. В той же час, інкубація гомогената міокардіоцитів з обзіданом приводила до активації ферменту у старих тварин, тоді як у дорослих такі зміни були відсутніми.

Відсутність ефекту при інкубації ПМ міокардіоцитів з обзіданом, певне, пояснюється тим, що введення обзідану порушує, в першу чергу, не мембранні, а опосередковані механізми адренергічного контролю активності Na, K-АТФази.

При вивченні вікових особливостей впливу альфа-адренергічної блокади на ФЛ склад ПМ міокардіоцитів, нами було встановлено, що триденне введення дібенаміну викликало у дорослих тварин зниження рівня ФХ (контроль - $37,1 \pm 0,9$ %, дослід - $30,5 \pm 1,2$ %, $p < 0,05$) і ФІ (контроль - $15,4 \pm 0,9$ %, дослід - $9,1 \pm 0,4$ %, $p < 0,05$), та підвищення рівня сфінгомеліну (СМ) (контроль - $7,0 \pm 0,3$ %, дослід - $11,6 \pm 1,1$ %, $p < 0,05$). У старих тварин хронічне введення дібенаміну викликало значне збільшення ліаоформ ФХ (контроль - $0,3 \pm 0,02$ %, дослід - $7,3 \pm 0,5$ %). При розрахунку коефіцієнтів співвідношень різних фракцій ФЛ

було встановлено, що хронічне введення дебінаміну у дорослих тварин викликає зниження коефіцієнту $\Phi X/\Phi C$ (контроль-4,6±0,02, дослід-3,1±0,02, $p < 0,05$) а у старих тварин збільшення коефіцієнтів загальні $XС/\Phi L$ (контроль-0,64±0,08, дослід-1,0±0,02, $p < 0,05$), $XС/\Phi X$ (контроль-2,2±0,02, дослід 3,1±0,06, $p < 0,05$).

Зниження коефіцієнту $\Phi X/\Phi C$ у старих щурів може бути ознакою зниження синтезу ΦX із ΦC .

Значний інтерес викликає збільшення у старих щурів під впливом хронічного введення альфа-адреноблокатора лізо- ΦX , що може бути свідченням процесу деструкції ΦL по вільно-радикальному механізму і активації фосфоліпаз типу A_2 , обумовленої дібенаміном. У свою чергу зростання лізо- ΦX може бути причиною підвищення лабілізації мембран, і змін їх структури, зменшення мікрров'язкості ліпідного матриксу, змін властивостей мембрано-з'язаних ферментів.

Відмінності в реакції ΦL складу ПМ міокардіоцитів дорослих і старих тварин на хронічне введення альфа-адреноблокатора, можливо, пов'язані із зменшенням у процесі старіння кількості міокардіальних альфа-адренорецепторів, а також з порушеннями механізмів синтезу ΦL у старих тварин.

Хронічне введення альфа-адреноблокатора не викликало змін активності $Na, K-ATPази$ ПМ міокардіоцитів ні у дорослих, ні у старих тварин.

Таким чином, на основі одержаних даних можна зробити висновок, що хронічне введення альфа- або бета-адреноблокаторів викликає схожі зміни в ΦL спектрі ПМ міокардіоцитів дорослих щурів. Це може свідчити про те, що прямі механізми реалізації сигналу при стимуляції міокарда альфа- або бета-адреноблокаторами у дорослих тварин схожі і опосередковані через модифікацію ΦL складу ПМ міокардіоцитів. В той же час відмінності впливу на активність $Na, K-ATPази$, можливо, пов'язані з різними механізмами активації, опосередкованими через внутрішньоклітинні фактори, що можливо, обумовлено переважною локалізацією альфа-адренорецепторів у коронарних судинах.

На наступному етапі досліджень нами було вивчено вплив інсуліну на ΦL склад і активність $Na, K-ATPази$ ПМ міокардіоцитів.

Хроматографічний аналіз спектру ФЛ ПМ міокардіоцитів показав, що введення інсуліну викликало у дорослих тварин зростання рівня ФАЕ і зниження - ФІ, а у старих тварин збільшення рівня ФАЕ і зниження концентрації КЛ (Мал. 3).

Поряд з цим, введення інсуліна викликало у дорослих тварин зростання коефіцієнту ФАЕ/ФС (контроль- $2,5 \pm 0,02$, дослід- $3,7 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Цей факт може свідчити про підвищений метаболізм ФАЕ за рахунок використання ФС.

На основі одержаних даних можна припустити, що значне зниження рівня ФІ в ПМ міокардіоцитів дорослих тварин під впливом хронічного введення інсуліну, викликане активацією обміну ФІ. Останнє повинно приводити до інтенсифікації внутрішньоклітинного метаболізму, зокрема, біосинтетичних процесів, через вторинні посередники "поліфосфоінositіди-діацилгліцерол".

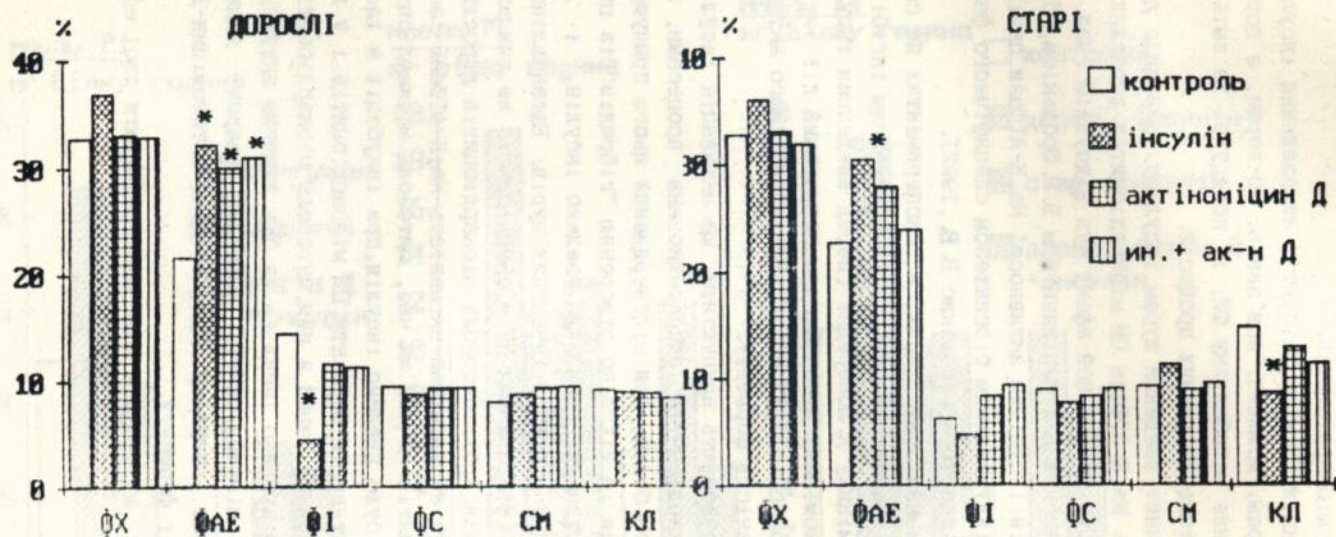
Відсутність подібного ефекту у старих тварин може, можливо, визначитися меншою активацією ФІ-обміну або порушеннями метаболізму ФЛ у ПМ міокардіоцитів.

✓ Відомо, що інсулін є регулятором інтенсивності біосинтетичних процесів у клітині. В той же час, роботами В. В. Фролькіса було доведено, що існує взаємозв'язок між активністю біосинтезу білка і станом ПМ /Фролькіс В. В., 1981, 1990/. Для вивчення цих механізмів нами були проведені дослідні з використанням блокатору синтезу білка актиноміцину Д.

Введення актиноміцину Д спричиняло підвищення рівня ФАЕ у ПМ міокардіоцитів дорослих тварин. ФЛ склад ПМ міокардіоцитів старих щурів залишався незмінним (Мал. 3). Попереднє введення актиноміцину Д (за 30 хвилин до введення інсуліну) запобігало змінам ФЛ складу ПМ міокардіоцитів, як у дорослих, так і у старих тварин, за винятком, як і при введенні тільки актиноміцину Д, збільшення рівня ФАЕ у ПМ дорослих щурів. Тобто, попереднє введення актиноміцину Д знімало ефекти інсуліна щодо змін ФЛ складу ПМ міокардіоцитів у дорослих і старих тварин.

На основі цих даних можна зробити висновок, що вплив інсуліну на ПМ міокардіоцитів може бути не тільки прямим, а й опосередованим, через внутрішньоклітинні процеси із залученням генома. Можливо, введення інсуліну призводить до запускання механізмів,

Вплив інсуліну та актиномицину Д на фосфоліпідний склад ПМ міокардіоцитів шурів різного віку



Мал.3.

* - $p < 0,05$

пов'язаних з біосинтезом білка, який, у свою чергу, може впливати на модифікацію ПМ міокардіоцитів.

Відмінність реакцій ПМ міокардіоцитів на введення інсуліну дорослим і старим щурам, можливо, пов'язана, по-перше, з порушеннями в процесі старіння метаболізму ФЛ, і, по-друге, із змінами біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів.

Внутрішньочеревинне введення щурам інсуліну приводило до підвищення активності Na,K-АТФази ПМ міокардіоцитів дорослих щурів, тоді як у старих тварин цей ефект був відсутнім (Мал. 4).

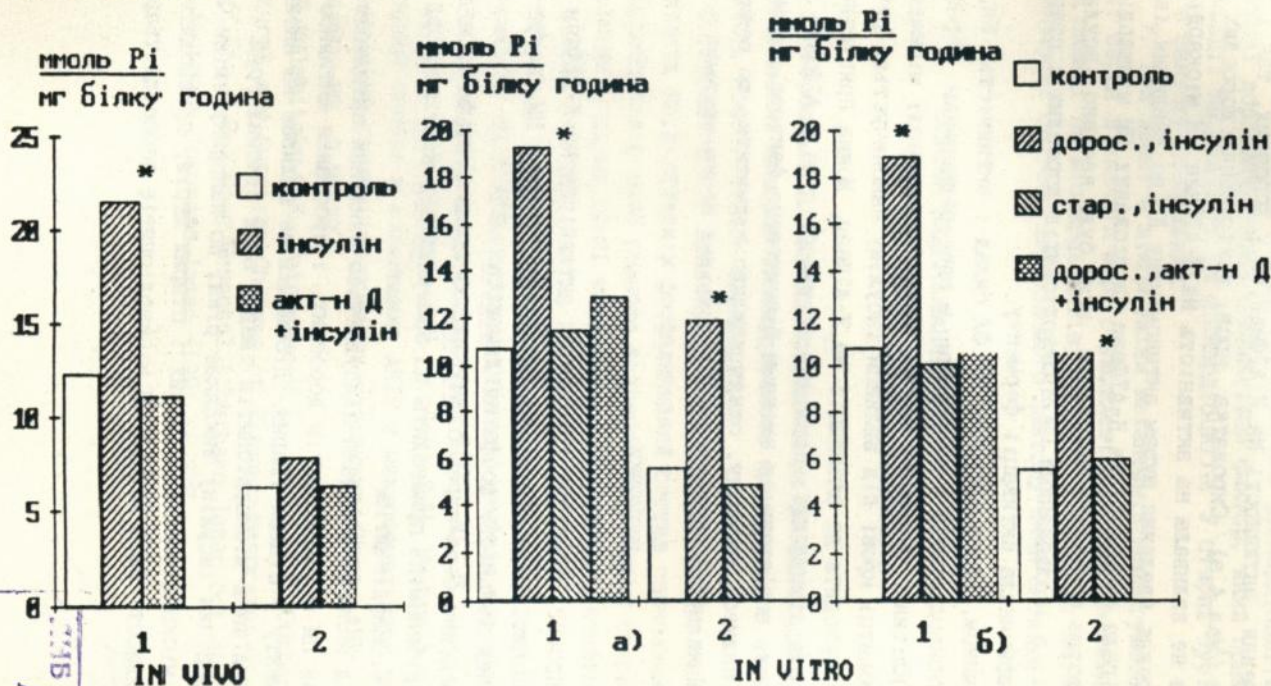
У роботах, проведених під керівництвом В. В. Фролькіса, було показано, що активація інсуліном активності Na,K-АТФази печінки пов'язана з інсулін-індукованим біосинтезом специфічного фактора пептидної природи - інвертора (Фролькіс В. В., 1992).

Для підтвердження цих даних в експериментах на серці, нами були проведені експерименти з використанням інгібітору синтезу білка актиноміцину Д. Попереднє (перед введенням інсуліну) введення щурам актиноміцину Д запобігало активуючій дії інсуліну на Na,K-АТФазу ПМ міокардіоцитів щурів. Введення одного актиноміцину Д не впливало на активність ферменту.

Одержані дані дозволяють припустити, що активація інсуліном Na,K-АТФази ПМ міокардіоцитів опосередкована процесами, які зв'язані з біосинтезом білка. Для підтвердження цього припущення були проведені дослідження *in vitro* по створенню "гібридів" із цитозолей міокардіоцитів тварин, яким було введено інсулін, і ПМ міокардіоцитів дорослих і старих інтактних щурів. Встановлено, що інкубація інсуліну з ізольованими ПМ міокардіоцитів не викликала активації ферменту (Мал. 4, 6). Цитозоль міокардіоцитів дорослих і старих інтактних щурів не змінював активність Na,K-АТФази ізольованих ПМ міокардіоцитів. У той же час, цитозоль міокардіоцитів дорослих щурів, яким було введено інсулін, при інкубації з ізольованими ПМ викликав активацію ферменту ПМ міокардіоцитів і у дорослих і у старих тварин. Поряд з цим, цитозоль міокардіоцитів старих тварин, яким було введено інсулін, не був здатним активувати Na,K-АТФазу. Цитозоль міокардіоцитів дорослих тварин, яким за 30 хвилин до введення інсуліну було введено актиноміцин-Д, не приводив до активації ферменту.

Можна припустити, що інсулін може опосередкувати свої ефекти

Вплив інсуліну на активність Na,K-АТФ-ази плазматичних мембран міокардіоцитів щурів різного віку



Нап. 4 1-дорослі щур, 2-старі щур; а) -інкубація ПМ з сироваткою крові ін'єцированих тварин, б)-інкубація ПМ з цитозолем міокардіоцитів ін'єцированих тварин.* - $p < 0,05$.

не тільки через цитозоль міокардіоцитів, але й через сироватку крові, у тому випадку, якщо фактор, що активує Na, K-АТФазу, попадає у кров. При інкубації ізольованих ПМ міокардіоцитів з сироваткою крові дорослих щурів, яким було введено інсулін, спостерігалось підвищення активності Na, K-АТФази, як у дорослих, так і у старих щурів (Мал. 4, а). Сироватка крові контрольних дорослих і старих щурів не впливала на активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів. Попереднє введення шурам актиноміцину Д (до введення інсуліну) запобігало активації Na, K-АТФази ізольованих ПМ міокардіоцитів. Сироватка крові старих тварин, яким було введено інсулін, при інкубації з ізольованими ПМ міокардіоцитів дорослих і старих щурів, не спричиняла активації ферменту.

Таким чином, вплив інсуліну на ФЛ склад і активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів є не прямим, а опосередкованим через цитоплазму клітин і сироватку крові. Мабуть в цитозолі міокардіоцитів і сироватці крові під впливом інсуліну накопичується речовина, яка призводить до активації Na, K-АТФази. Можна припустити, що відсутність стимуляції інсуліном активності Na, K-АТФази у старих тварин, пов'язана із змінами біосинтезу фактора, який обумовлено впливом інсуліну, однак важливо відмітити, що реакція фермента ПМ на цей фактор у процесі старіння не змінюється.

ВИСНОВКИ.

1. В процесі старіння знижується активність Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів, що обумовлене змінами ФЛ складу ПМ, зокрема, зниженням кількості фосфатиділіногіта.
2. Введення бета-адреноблокатора обзідана і альфа-адреноблокатора дібенаміна призводить до залежних від віку змін ФЛ складу ПМ міокардіоцитів.
3. Під впливом обзідана відбувається зниження активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів дорослих і зростання активності цього ферменту у старих тварин. Дібенамін не впливає на активність Na, K-АТФази міокардіоцитів тварин обох вікових груп.
4. Введення інсуліну викликає різні по напрямку зміни ФЛ складу ПМ міокардіоцитів дорослих і старих щурів, призводить до росту активності Na, K-АТФази ПМ міокардіоцитів дорослих тварин.

5. Попереднє введення інгібітора синтезу білка актиноміцина Д знімає вплив інсуліну на ФЛ склад і активність Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів у дорослих і старих щурів.

6. Під впливом інсуліну у цитозолі міокардіоцитів і сироватці крові дорослих тварин виявляється фактор, який призводить до активації Na, K-ATФази ПМ міокардіоцитів. У старих щурів синтез цього фактору ослаблений.

7. Пов'язані з віком зміни механізмів нейрогуморальної регуляції серця в значній мірі обумовлені взаємозв'язаними зрушеннями у ФЛ складі ПМ міокардіоцитів, змінами активності Na, K-ATФази, інтенсивності синтезу цитозольного фактору, який активує цей фермент.

СПИСОК НАДРУКОВАНИХ ПРАЦЬ
ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ:

✓ 1. Горбань Е. Н. Влияние обсеидана на фосфолипидный состав плазматических мембран миокардиоцитов крис разного возраста// ДАН УССР, -1991. -N 11. - С. 135-137.

2. Горбань Е. Н., Кульчицкий О. К. Влияние анаприлина на активность Na, K-ATФази и фосфолипидный состав сарколемми миокардиоцитов у крис разного возраста//Механизми старения и долголетия (Сухуми, 19-21 июня 1991 г.): Материали конфер. Тбилиси - 1991. -С. 325.

3. Горбань Е. Н. Влияние инсулина на фосфолипидный состав и активность Na, K-ATФази плазматических мембран миокардиоцитов//Проблеми старения и долголетия. -1993. -N1. -С. 38-40.

4. Саутин Ю. Ю., Тронько Н. Д., Горбань Е. Н., Микоша А. С. Фосфолипидный состав и связывание АКГГ в микросомах кори надпочечников морских свинок, получавших пролактин//Докл. АНУ-ССР. -1990. -N2. -С. 70-73.

5. Kulchitsky O. K., Potapenko R. I., Sabko V. E., Gorban E. N. Structurel and function Changes of Plasmic Membranes in Aging// The 4 Reg. Cong. Gerontol. (Yokohama, Japan, oct. 31-nov. 3, 1991): Abstacts. Jokohama, Japan. -1991. -P. 378.

АВ 29.137

АВ 29.137

Подписано к печати 19.01.1994 г. Формат 60x84/16
Бумага офсетная . Тираж 100, Заказ 123. Бесплатно

г. Киев