

УДК 617.127+576.311.34

В. Р. БАУМАН, О. Я. ПУПЕЛЕ, И. А. КИЕНКАС,
Б. К. ШЕЛУХИНА, В. А. КОРЗАН

ЛАТЕНТНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

В патогенезе поражения миокарда ведущая роль отводится лизосомам, когда вследствие действия различных механизмов активации лизосомальные гидролазы переваривают клеточные компоненты и вызывают гибель клетки [4, 13]. Среди постулируемых механизмов важное значение отводится мембранному гипотезу, согласно которому дезинтеграция лизосомальных мембран приводит к освобождению гидролиз [3]. Однако непосредственное изучение функций лизосом, и лизосомальных мембран имеет определенные технические трудности и авторы часто затрудняются дать полную количественную характеристику полученных результатов [11]. По сей день продолжаются поиски оптимальных методов количественной оценки латентности лизосом [5]. Наша работа посвящена поиску оптимальных условий изучения латентности лизосомальных ферментов миокарда при экспериментальной патологии сердца—адреналиновом миокардите, тотальной ишемии (автолиз), медикаментозном наркозе, гипотермии (23°C).

Опыты были поставлены на крысах-самцах весом 230—280 г, которым вводили адреналин (5 мкг и 300 мкг/100 г) или, согласно [7], вызывали тотальную ишемию миокарда, медикаментозный наркоз и гипотермию [1]. Наркотизированных эфиром или наркозной смесью (тиопентал, морфин, оксibuтират, атропин) крыс декапитировали, брали кровь и миокард для изучения. Миокард гомогенизировали, фракционировали дифференциальным центрифугированием [10], выделяли митохондриально-лизосомальную фракцию. Во всех фракциях определяли количество белка, активность кислой фосфатазы, катепсина Д, β -глюкуронидазы [2]. О латентности лизосомальных ферментов судили по возрастанию активности ферментов после обработки лизосом тритоном $\times 100$ (0,1%) и по соотношению активностей лизосомальных ферментов в 40 000 g осадке и супернатанте.

Результаты и их обсуждение. Существенное значение при работе с лизосомами миокарда имеют мягкие условия гомогенизации. Применение буферного раствора с KCl 0,25 М и гомогенизация вручную в течение 5 мин при 0°C в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком

обеспечивало экстракцию 60—62% белка и 70—80% активности кислой фосфатазы, катепсина Д и β -глюкуронидазы в 800 g супернатанте (10 мин). Более энергичная гомогенизация (2×30 сек, 500—1000 об/мин) хотя и повышала выход ферментов до 90%, в то же время приводила к значительной дезинтеграции лизосом, поэтому был выбран первый способ гомогенизации.

Для выявления сдвигов латентности при экспериментальной патологии предварительно было изучено влияние ряда внешних факторов на активность и латентность лизосомальных ферментов, условия дезинтеграции лизосом тритоном (рис. 1).

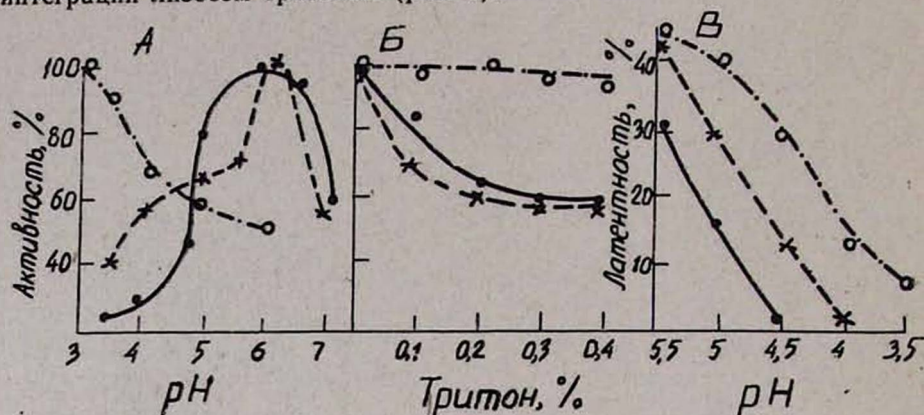


Рис. 1. Влияние внешних факторов на активность и латентность лизосомальных ферментов миокарда (—•—кислая фосфатаза, — Δ — Δ — β -глюкуронидаза, —О—О—катепсин Д). А. pH оптимум лизосомальных ферментов (40 000 g супернатант); Б. Влияние тритона на активность лизосомальных ферментов миокарда (40 000 g супернатант, тритон X 100, 10 мин, 37°C, pH 5); В. Влияние pH на латентность лизосомальных ферментов миокарда (40 000 g осадок, латентность=100×

$$\times \frac{\text{акт. с тритоном} - \text{акт. без тритона}}{\text{активность с тритоном}}$$

Как видно из рисунка, во-первых, pH оптимум лизосомальных ферментов миокарда существенно не отличается от ферментов печени. Наблюдаются также характерные два пика активности β -глюкуронидазы [2], во-вторых, резкие сдвиги латентности ферментов лизосом в зависимости от pH требуют изучения ее вне оптимального действия pH фермента (катепсин Д или при значениях pH, когда наблюдаемую активность фермента могут исказить другие ферменты со сходной субстратной специфичностью (кислая фосфатаза). Заметное влияние тритона на активность кислой фосфатазы, по-видимому, является причиной кажущейся более низкой латентности данного фермента в миокарде по сравнению с катепсином Д. Таким образом, ряд внешних факторов может существенно влиять на активность и латентность лизосомальных ферментов миокарда.

При тотальной ишемии (автолиз 60 мин) наблюдалось повышение активности кислой фосфатазы и β -глюкуронидазы, по сравнению с контролем (с 1,19 и 4,33 до 1,25 и 5,45 усл. ед./мг белка соответственно). При

гипотермии и медикаментозном наркозе наблюдалось повышение свободной активности катепсина Д, β -глюкуронидазы и кислой фосфатазы, однако сдвиги латентности статистически недостоверны. Сдвиги активностей лизосомальных ферментов и их латентности при адреналиновом миокардите приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Активность кислой фосфатазы, β -глюкуронидазы в миокарде крыс
при адреналиновом поражении миокарда

	Три- тон	Контроль	Адреналин 5 мкг/100г	Адреналин 100 мкг/100г
Кислая фосфатаза мкМ вы- делившегося	—	15,8 $\pm$ 0,24	11,5 $\pm$ 1,13*	12,9 $\pm$ 1,10*
п-нитрофенола на 1г сердца за 30 мин	+	16,9 $\pm$ 0,36	11,7 $\pm$ 1,21*	12,4 $\pm$ 0,96*
β -глюкуронидаза мкМ выде- лившегося	—	0,709 $\pm$ 0,090	0,428 $\pm$ 0,056*	0,452 $\pm$ 0,048*
фенолфталеина на 1г сердца за 60 мин	+	1,360 $\pm$ 0,142	0,706 $\pm$ 0,128*	0,810 $\pm$ 0,137*

Примечание. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из табл. 1, при введении адреналина через 24 часа наблюдается снижение общей активности лизосомальных ферментов в миокарде. По-видимому, катехоламинами действительно вызываются нарушения целостности клеточных мембран, и происходит соответствующая элиминация ферментов. Что же касается нарушения функции лизосомальных мембран, то судить об этом по результатам, показывающим латентность ферментов с тритоном, практически невозможно—во-первых, результаты отличаются значительным разбросом, во-вторых, одновременно с разрушением лизосомальных мембран тритоном и освобождением внутрилизосомальных ферментов происходит определенная их инактивация (рис. 1). Поэтому активность кислой фосфатазы в отдельных случаях с тритоном меньше, чем без детергента.

Более стабильным показателем было соотношение седиментируемой при 40 000 g, т. е. связанной с частицами—лизосомами, активности ферментов и активности, оставшейся в супернатанте. Так, несмотря на низкую латентность кислой фосфатазы в опытах с тритоном, седиментация фермента при ультрацентрифугации практически не отличалась от β -глюкуронидазы, катепсина Д и составляла 50—60%. Введение токсических доз адреналина вызывало 5—10% снижение седиментируемой при 40 000g доли ферментов. Сходные сдвиги активностей катепсина Д, кислой фосфатазы, β -N-ацетил-глюкозаминидазы при введении изопротеренола и автолизе миокарда кролика были получены Вильцентовом и соавт. [8, 9], и имеющиеся различия результатов от данных других авторов объясняются различными сроками исследования. Этим, по-видимому, объясняются и наблюдаемые нами различные сдвиги активности лизосомальных ферментов при автолизе (1 час), гипотермии (с учетом времени наркоза и введения в гипотермию 3 часа) и адреналиновых поражениях миокарда (18—24 часа).

Таким образом, при глубоких поражениях миокарда, когда активность аминотрансфераз в крови увеличивается больше чем вдвое, десятикратно снижается уровень АТФ в миокарде (наши предварительные опыты, результаты не приводятся), выявленные сдвиги латентности или седиментационных свойств лизосом становятся еле уловимы. Хотя показано [6], что лизосомальные протеазы могут вызвать повреждение митохондрий *in vitro*, и, следовательно, нарушить энергопродукцию клетки, трудно предположить, что нарушение целостности лизосомальных мембран, приводящее уровень не связанной с органеллами активности ферментов с 45 до 55%, является главным патогенетическим механизмом при развитии поражения миокарда. Литературные данные и наши собственные опыты по изучению уровня АТФ в миокарде при экспериментальной патологии дают основание предположить, что снижение энергообразования в миокарде может быть причиной нарушения ионных сдвигов, в том числе рН, приводящих к активации не связанных с лизосомами кислых гидрол миокарда, усугубляющих функции митохондрий и других органелл клетки.

Таким образом, для определения роли лизосом при развитии поражения миокарда требуется развитие новых подходов к изучению целостности лизосомальных мембран и их функций.

Рижский медицинский институт

Поступила 23/IX 1983 г.

Վ. Բ. ԲԱՈՒՄԱՆ, Օ. ՅԱ. ՊՈՒՊԵԼԵ, Ի. Ա. ՎԻՆԿԱՍ, Բ. Կ. ՇԵԼՈՒԽԻՆԱ, Վ. Ա. ԿՈՐԶԱՆ

ՄՐՏԻ ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ԱԽՏԱՐԱՆՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ ԼԻՋՈՍՈՄԱԼ
ՅԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԹԱՔՆՎԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ն ո ւ մ

Ցույց է տրված, որ արտաքին մի շարք պայմաններ կարող են ազդել սրտամկանի լիզոսոմալ ֆերմենտների ակտիվության և թաքնվածության վրա: Տոտալ սակավարյունության, հիպոթերմիայի ժամանակ լիզոսոմալ ֆերմենտների ակտիվությունը բարձրացել է, սրտամկանի ադրենալինային ախտահարման ժամանակ թթու ֆոսֆատազի, β -գլյուկոնուրոնիդազի, D կատեպսինի բնօրինակը բանակը իջել: Միաժամանակ լիզոսոմների թաքնվածության տեղաշարժերը ավելի փոքր են արտահայտված: Քննարկվում է լիզոսոմների դերը սրտամկանի վնասման ախտածնության մեջ:

V. R. Bauman, O. Ya. Puple, I. A. Kienkas, B. K. Shelukhina.
V. A. Korzan

Latence of Lysosomal Ferments of Myocardium in Experimental Cardiac Pathology

S u m m a r y

It is shown that a number of the external factors may influence the activity and latency of myocardial lysosomal ferments. In total ischemia and hypothermia the activity of the lysosomal ferments increase, in adrenalectic affection of the myocardium the total content of acid phosphatase, β -glucuronidase, cathepsin D decreases. At the same time the shifts of the lysosomal latency were less expressed. The role of lysosomes in the pathogenesis of the myocardial affection is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бауман В. Р., Гром Н. П., Силова А. А., Корзан В. А. Материалы VI Конференции биохимиков Прибалтийских республик Белорусской ССР, Л., «Зинатне». Рига, 1981, 344—345.
2. Лизосомы Под ред. Дж. Дингла. «Медицина». М., 1980.
3. Меерсон Ф. З., Голубева Л. Ю., Казан В. Е., Шимакович М. В., Уголев А. А. В. кн.: «Метаболизм миокарда», «Медицина». М., 1980, 237—251.
4. Пауков В. С., Фролов В. А. Элементы теории патологии сердца. «Медицина». М., 1982.
5. Покровский А. А., Тумелян В. А. Лизосомы. «Медицина». М., 1976.
6. Allan R. M., Wellman E. Biochem. J., 1980, 190, 139—144.
7. Armiger L. C., Seelye R. N., Carnell V. M., Smith C. U., Gavin J. B., Henderson P. B. Lab. Invest., 1976, 34, 354—362.
8. Decker R. S., Poole A. R., Dingle J. T., Wildenthal K. J. Molec. Cell. Cardiol., 1979, 11, 189—196.
9. Mueller E. A., Griffin W. S., Wildenthal K. J. Molec. Cell. Cardiol., 1977, 9, 565—578.
10. Rannels D. E., Kao R., Morgan H. E. J. Biol. Chem., 1975, 250, 1694—1701.
11. Ruth R. C., Kennett F. F., Weglicki W. B. J. Molec. Cell. Cardiol., 1978, 10, 739—751.
12. Wellman E., Peters T. J. J. Molec. Cell. Cardiol., 1976, 8, 433—463.
13. Wildenthal K. J. Molec. Cell. Cardiol., 1978, 10, 595—603.

УДК 616.127—005.8:615.22

А. Л. УРАКОВ

РЕГИСТРАЦИЯ ТОНУСА ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРДИОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ

Одной из самых простых методик определения степени ишемического повреждения органов является измерение их электропроводности [1]. Однако проведенные нами исследования показывают, что изменение электропроводности миокарда в первые десятки минут ишемии отражает не столько процесс ишемического повреждения, сколько происходящее параллельно с ним изменение реологических свойств крови в исследуемом участке—тромбообразование [2]. В связи с вышеизложенным, нами предлагается методика регистрации тонуса ишемизированного миокарда как один из способов характеристики кардиотропных веществ.

Методика. Суть метода заключается в измерении мышечного тонуса миокарда. Основанием для рекомендации данной методики является установление тесной корреляции между развитием ишемической контрактуры и появлением необратимого повреждения в ишемизированном миокарде [4]. Для регистрации тонуса нами предлагается использовать свежесеченный кольцеобразный сегмент толщиной 1 мм из левого желудочка крысы. Изолированный сегмент помещается в специальный раствор герметической термостатируемой камеры, где соединяется с механотроном. Регистрация тонуса производится тензометрически в изометрическом режиме по общепринятой методике [3].

Результаты и их обсуждение. Проведенные нами исследования по-