

## Токсин стафілокока модулює регуляторні механізми скорочення—розслаблення кільцевих гладеньких м'язів товстого кишечника

Т. Л. Давидовська, О. В. Цимбалюк, М. С. Мірошніченко

*Досліджували вплив токсину стафілокока (СТ) у концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6}$ — $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лг на скоротливу активність тонких (150—200 мкм) гладеньком'язових смужок (ГМС) саєсит морських свинок, викликану дією нейромедіатора ацетилхоліну, а також аплікацією гіперкальцієвого розчину та кофеїну. З'ясовано, що СТ дозозалежно змінює провідність потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу, пригнічує індуквані кофеїном скорочення ГМС. Ця речовина блокує проведення сигналу агоніста по електро- та фармакомеханічному шляхах від  $M_2$  та  $M_3$  холінорецепторів до скоротливого апарату гладеньком'язових клітин.*

**Вступ.** У родину токсинів стафілокока (СТ) входять розчинні у воді одноланцюгові поліпептиди. Однією з їхніх основних властивостей є здатність утворювати асиметричні трансмембранні каналі структури з певною іонною селективністю [1—3]. Величина дискретної провідності цих каналів такого ж порядку, як і провідності вбудованого в біліпідну мембрану нікотинного холінорецептора [1]. Здатність до формування каналів є характерною для багатьох мікробних токсинів. На рівні організму це є однією з причин септичного шоку [4]. Згідно з літературними даними, пора токсину утворюється в процесі формування олігомера, який складається з шести білкових субодиниць [5, 6]. Зовнішній діаметр каналу становить 75, внутрішній — 25 Å [7]. Дослідження, проведені на штучних біліпідних мембранах, виявили, що токсин стафілокока є амфипатичною молекулою, гідрофобна поверхня якої занурена в неполярну область ліпідного бішару, а гідрофільна — заряджена і контактує з розчинником. Особливості пороутворення вивчали на  $\alpha$ -токсині [8]. В результаті показано, що з гідрофобним оточенням контактують його N- та C-кінці, тоді як середній сегмент молекули з ним не контактує.

Вплив СТ на тканини організму має складний системний характер, який не завжди можна пояснити лише порушенням цілісності мембрани. До-

сліді, проведені на кардіоміоцитах, також підтверджують складність згаданого впливу [9]: по-перше, при перфузії смужки серця (міокард шлуночка жаби) цією речовиною спостерігається збільшення амплітуди скорочень у відповідь на електричну стимуляцію з постійною частотою за рахунок розкриття нових кальцієвих каналів у плазматичній мембрані; по-друге, відбувається активація актоміозинового комплексу і, по-третє, має місце підвищення навантаження на кальційтранспортуючі системи. В більш високих концентраціях СТ викликає прогресуюче зменшення амплітуди потенціалів дії клітин — «водіїв» ритмів та пригнічення скорочення, яке пов'язане із зниженням трансмембранного іонного градієнта та потужності кальційтранспортуючих систем. Аналогічні дані були отримані на вушках передсердь морських свинок [4]. СТ зменшує реактивність серцевого м'яза до впливу гіпо- та гіперкальцієвих розчинів, що пов'язано з гальмуванням за даних умов внутрішньоклітинних ферментативних систем, відповідальних за видалення вільного кальцію із скоротливого апарату. Прискорення відновлювальних постактиваційних процесів спостерігається за умов зниження внутрішньоклітинної концентрації кальцію, як вважають, за рахунок зміни кінетики дисоціації  $Ca^{2+}$ -тропонінового комплексу [4]. Поряд з цим токсин здатний активувати вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо та (або) гальмувати процеси внутрішньоклітинного зв'язування іонізованого  $Ca^{2+}$  [5]. СТ впливає на гладенькі м'язи

судин, викликаючи їхнє системне враження [10]. На клітинах ендотелію судин легеневої артерії при введенні цієї речовини у кров'яне русло було показано, що надлишковий вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через трансмембранні пори, утворені токсином, підвищує інтенсивність обміну арахідонової кислоти. Це призводить до зростання тиску та проникності судин [11]. Досліди на гладеньких м'язах сечовика виявили, що стафілококовий  $\alpha$ -токсин спочатку підвищує ефект електростимуляції, призводячи інколи до спонтанних реакцій, а потім збільшує амплітуду скорочень. При тривалій його аплікації вказані показники знижуються, кінець кінцем зникаючи зовсім. Ці зміни є незворотними. Одним з визначальних факторів стимулюючої дії токсину за даних умов, як вважають автори, є мобілізація  $\text{Ca}^{2+}$  з примембранних фракцій цих катіонів [2].

Метою роботи було вивчення впливу різних концентрацій СТ на скорочення гладеньком'язових смужок (ГМС) кільцевого шару товстого кишечника (*caecum*) морських свинок, викликані деполаризацією плазматичної мембрани, кофеїном та агоністом мускаринових рецепторів ацетилхоліном.

Матеріали і методи. Досліди виконували на тонких (150—200 мкм) ГМС *caecum* морських свинок. Скоротливу активність ГМС вивчали в ізометричному режимі при їхній оптимальній довжині за допомогою електромеханічного перетворювача 6MX1С. Препарати розтягували до прояву максимального ефекту речовини, яка індукувала скорочення. Електричні сигнали реєстрували за допомогою електричного потенціометра КСП-4. Перед кожним дослідом ГМС витримували в робочій камері з проточним розчином Кребса протягом 60 хв.

Фізіологічний розчин був наступного складу (мМ):  $\text{NaCl}$  — 120,4;  $\text{KCl}$  — 5,9;  $\text{NaHCO}_3$  — 15,5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 1,2;  $\text{MgCl}_2$  — 1,2;  $\text{CaCl}_2$  — 2,5; глюкоза — 11,5; рН 7,4. Гіперкалієвий розчин (80 мМ) готували шляхом еквімолярної заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини  $\text{NaCl}$  на  $\text{KCl}$ . У досліді використовували стандартний СТ виробництва Інституту епідеміології та мікробіології ім. М. Ф. Гамалії Академії медичних наук Росії (концентрацію СТ розраховували у гемолітичних одиницях, Lh); хлорид ацетилхоліну ( $10^{-8}$ — $10^{-4}$  М), кофеїн (20 мМ) — фірми «Sigma» (США); сульфат атропіну ( $10^{-6}$  М) (ГНЦЛС, Україна). Характеристичні параметри гіперкалієвої контрактури розраховували за методом кінетичного аналізу [11]. У роботі відповідно до методу, зазначеного вище, лінеаризацію кривих кофеїніндукованих скорочень здійснювали в координатах  $[\ln(f_j/f_i); \ln(1 + \Delta t/t)]$ , де  $f_i$  — значення сили на рівні фази скорочення в

момент часу ( $t < \tau_0$ ), а  $f_j$  — значення сили на рівні фази розслаблення в момент часу ( $t + \Delta t > \tau_0$ ) ( $\Delta t = \text{const}$ ). Лінеаризовані графіки характеризувалися високим коефіцієнтом кореляції  $r = 0,991$ — $0,997$ .

Статистичну обробку результатів експериментів проводили за загальноприйнятою методикою [13]. У роботі використовували стандартний пакет математичної графіки Origin 5.0. Відповідні розрахунки було виконано на персональному комп'ютері Pentium-ММХ.

Результати та обговорення. У досліді тону ГМС, які знаходилися в нормальному розчині Кребса (НРК) (60 хв) перед початком вивчення дії СТ, залишався сталим. Цей параметр не змінювався також при внесенні до фізіологічного розчину токсину у концентрації  $1,6 \cdot 10^{-6}$  Lh, тривалість дії якого становила 30 хв, після чого за даних умов досліджували зміну механічної активності ГМ. Кожне наступне підвищення концентрації СТ відбувалося без попереднього відмивання препаратів НРК. З літератури [14] відомо, що аплікація гіперкалієвого розчину призводить до деполаризації плазматичної мембрани ГМК та відкриття потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу та появи вхідного кальцієвого струму через ці канали. В експериментах вивчали вплив СТ на скорочення, викликані гіперкалієвим розчином з концентрацією  $\text{K}^+$  80 М (відомо, що в межах концентрацій  $\text{K}^+$  від 40 до 100 М вольт-амперна характеристика  $I_{\text{Ca}}$  для ГМК є лінійною). Досліди показали, що токсин у концентрації  $1,6 \cdot 10^{-6}$  Lh за таких умов призводить до статистично достовірного збільшення амплітуди скорочення ( $f_m$ ). Як видно з рис. 1, описаний вище стимулюючий ефект на гіперкалієву контрактуру із збільшенням концентрації СТ зменшувався, змінюючись на пригнічення. Так, при концентрації  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Lh цей ефект становив  $69,2 \pm 4,6$  % ( $n = 7$ ) відносно норми, прийнятої за 100 %. При цьому спостерігалось незначне зменшення м'язового тону. Заміна тестового розчину (концентрація СТ  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Lh) на НРК супроводжувалася несуттєвим відновленням  $f_m$ , яке через 40 хв не перевищувало  $5 \pm 1,2$  % ( $n = 7$ ) від значення цього параметра на момент закінчення дії досліджуваної речовини. Отримані залежності зміни амплітуди скорочення, індукованого іонами  $\text{K}^+$ , від концентрації токсину були досліджені методами кінетичного аналізу [12]. За результатами аналізу, в умовах дії СТ значних змін, крім амплітуди, зазнавав такий характеристичний параметр механокінетичних кривих, як час ( $\tau_0$ ), за який відбувається наростання напруги м'яза до максимального значення (рис. 2). Так, у присутності токсину в концентрації  $1,6 \cdot 10^{-6}$  Lh цей параметр збільшу-

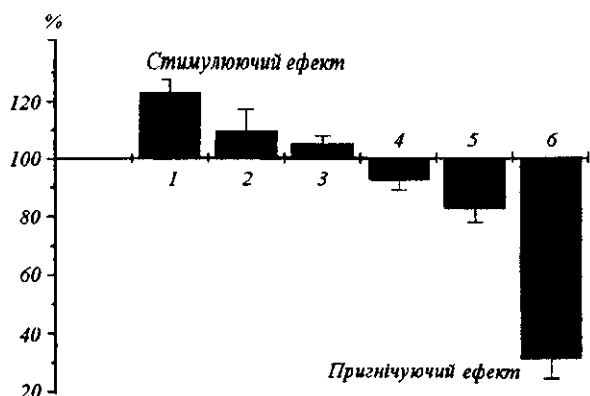


Рис. 1. Дозозалежний вплив токсину стафілокока на амплітуду скорочень гладеньком'язових смужок *saesim* морських свинок, індукованих гіперкалієвим розчином (80 мМ): 1 — концентрація токсину  $1,6 \cdot 10^{-6}$ ; 2 —  $1,6 \cdot 10^{-5}$ ; 3 —  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ; 4 —  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ; 5 —  $1,6 \cdot 10^{-2}$ ; 6 —  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Lh. По осі ординат — амплітуда скорочення. За 100 % прийнято контрольне значення скорочення

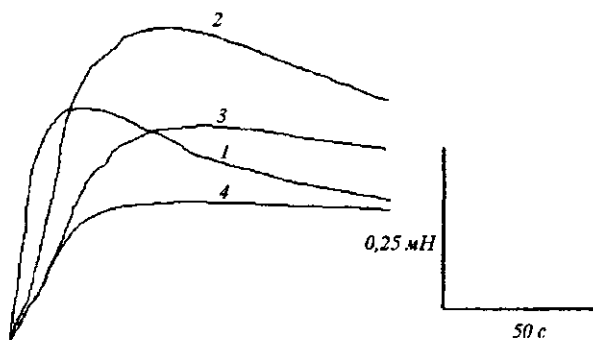


Рис. 2. Механокінетичні криві гіперкалієвої контрактури (80 мМ) гладеньком'язових смужок *saesim* морських свинок у контролі (1) та в присутності токсину стафілокока у концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6}$  (2);  $1,6 \cdot 10^{-3}$  (3) та  $1,6 \cdot 10^{-1}$  (4) Lh

вався і становив  $214,3 \pm 18,2$  % ( $n = 7$ ) відносно контрольного значення, прийнятого за 100 %. Підвищення концентрації СТ до  $1,6 \cdot 10^{-4}$  Lh призводило до трохи більшого зростання  $\tau_0$  (до  $243,3 \pm 22,1$  % ( $n = 7$ ) від контрольного). Максимальне зростання часу  $\tau_0$  ( $257,1 \pm 20,6$  % ( $n = 7$ ) від контрольної величини) спостерігалось при концентрації токсину  $1,6 \cdot 10^{-3}$  Lh. Збільшення концентрації токсину, наприклад, до  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Lh призводило до встановлення значення  $\tau_0$  на рівні  $228,6 \pm 14,4$  % ( $n = 7$ ) від контролю. Як видно з наведених даних,

незалежно від стимулюючого чи пригнічуючого ефекту СТ на амплітуду гіперкалієвої контрактури ГМС спостерігається стійка тенденція до збільшення часу, необхідного для досягнення нею свого максимального значення, що вказує на розвиток процесів гальмування надходження  $Ca^{2+}$  в ГМК. Зменшення ж амплітуди гіперкалієвої контрактури за даних умов (за винятком незначного стимулюючого ефекту при дії СТ у концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6}$  та  $1,6 \cdot 10^{-5}$  Lh) свідчить про зниження провідності мембрани для цих катіонів.

Відомо, що прийнятним критерієм, який кількісно характеризує вплив фізико-хімічних факторів на процес скорочення—розслаблення м'язів, є коефіцієнт швидкості ( $\kappa$ ) [12]. Визначається він, як

$$\kappa_c = V_c / V_c' \text{ — для фази скорочення; (1)}$$

$$\kappa_p = V_p / V_p' \text{ — для фази розслаблення, (2)}$$

де величини із штриховим індексом та без нього — максимальні швидкості скорочення ( $V_c$ ) та розслаблення ( $V_p$ ) ГМС після та до дії СТ відповідно. Для дослідження зміни  $\kappa$  в ряду збільшення концентрації СТ необхідно було визначити максимальні швидкості скорочення та розслаблення препаратів. Для цього здійснювали диференціювання зміни сили механокінетичних кривих у часі. Відомо, що фаза наростання напруги у відповідь на дію гіперкалієвого розчину на ГМС пов'язана з активуванням роботи систем, які забезпечують підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  в міоплазмі. Швидкість розслаблення м'яза відповідно залежить від ефективності роботи систем, що, врешті-решт, забезпечують виведення кальцію з міоплазми. Таким чином, порівняння  $\kappa_c$  та  $\kappa_p$  залежно від зміни концентрації СТ дозволяє додатково проаналізувати його вплив на механізми скорочення—розслаблення ГМС. У результаті показано, що модулювання регуляції систем транспорту  $Ca^{2+}$  *saesim* під дією СТ виявляється в усіх випадках його аплікування. Присутність СТ у концентрації  $1,6 \cdot 10^{-6}$  Lh призводить до зменшення максимальних швидкостей скорочення та розслаблення майже вдвічі ( $\kappa_c$  та  $\kappa_p$  становили  $1,95 \pm 0,14$  і  $1,75 \pm 0,12$  ( $n = 7$ ) відповідно) по відношенню до контролю, прийнятого за 1. Наступне збільшення концентрації СТ на один та два порядки ( $1,6 \cdot 10^{-5}$  та  $1,6 \cdot 10^{-4}$  Lh) призводило до підвищення  $\kappa_c$  до  $2,8 \pm 0,21$  та  $2,6 \pm 0,20$  ( $n = 7$ ) відповідно, тоді як  $\kappa_p$  зберігалася на тому ж рівні, що й у випадку аплікування  $1,6 \cdot 10^{-6}$  Lh. Цікаві результати мали місце в присутності проміжної концентрації токсину ( $1,6 \cdot 10^{-3}$  Lh): максимальна швидкість скорочення зменшувалася в  $3,4 \pm 0,32$

разу ( $n=7$ ), а показник максимальної швидкості розслаблення несуттєво відрізнявся від контрольних даних ( $\kappa_p = 1,2 \pm 0,04$ ,  $n=7$ ). Для концентрації СТ  $1,6 \cdot 10^{-2}$  Лх величини  $\kappa_c$  та  $\kappa_p$  становили  $2,59 \pm 0,19$  та  $2,1 \pm 0,15$  ( $n=7$ ) відповідно. Максимальна концентрація токсину, яку використовували в досліді ( $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх), уповільнювала процес скорочення м'яза майже в чотири рази ( $\kappa_c = 3,93 \pm 0,27$ );  $\kappa_p$  була на рівні  $2,66 \pm 0,26$  ( $n=7$ ) (рис. 3). Отже,  $\kappa_c$  та  $\kappa_p$  для всіх випадків аплікації СТ мають значення, більші за одиницю, що вказує на пригнічення систем введення та виведення кальцію за даних умов [12]. Свідченням останнього може бути отримане в експерименті збільшення тонічної компоненти гіперкалієвого скорочення в умовах дії СТ (рис. 2).

Враховуючи вищевикладене, можна припустити, що потенціювання амплітуди скорочення при дії СТ у концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6} - 1,6 \cdot 10^{-4}$  Лх у відповідь на аплікацію надлишку  $K^+$ , з одного боку, може бути зумовлене появою додаткових каналів провідності під дією цього білка, що згідно з літературними даними, може мати місце [1, 6], а з іншого, — пов'язане із збільшенням виходу  $Ca^{2+}$  з ріанодинчутливого депо саркоплазматичного ретикулу (СР) ГМК. Для перевірки цього було досліджено вплив різних концентрацій СТ на кофеїніндуковані (20 М) скорочення *saesit*. Встановлено, що їхня амплітуда за даних умов дозозалежно зменшувалася. Описаний ефект спостерігався як у нормальному, так і в номінально безкальцієвому розчині Кребса. При цьому максимальний ефект пригнічення досягався при концентрації СТ  $1,6 \cdot 10^{-3}$  Лх. Поряд з цим величина  $\tau_0$  зростала вже при мінімальній його концентрації в середовищі інкубації. Розрахунки  $\kappa_c$  та  $\kappa_p$  показали, що існує певна залежність між зміною кінетичних параметрів кофеїніндукованих скорочень ( $f_m$ ,  $\kappa_c$  та  $\kappa_p$ ) і дозою внесеного в розчин інкубації СТ.

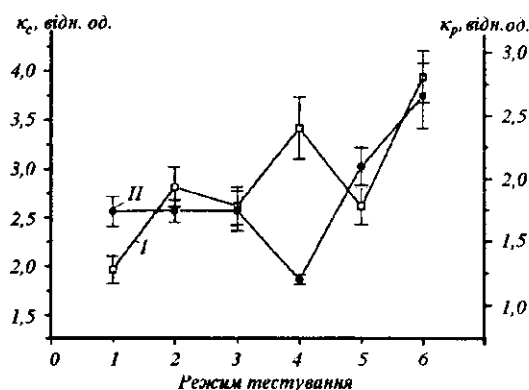


Рис. 3. Залежність коефіцієнтів швидкостей фаз скорочення (I) та розслаблення (II) скорочень гладеньком'язових смужок *saesit* морських свинок, індукованих аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ), від концентрації стафілококового токсину: 1 —  $1,6 \cdot 10^{-6}$ ; 2 —  $1,6 \cdot 10^{-5}$ ; 3 —  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ; 4 —  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ; 5 —  $1,6 \cdot 10^{-2}$ ; 6 —  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх відповідно

Результати представлено в таблиці, звідки видно, що токсин суттєво впливає на чутливість системи транспорту  $Ca^{2+}$  в ріанодинчутливому депо СР. Виходячи з даних кінетичного аналізу, цей вплив має місце як на рівні системи виходу  $Ca^{2+}$  із СР, так і його активного транспорту всередину. Враховуючи вищевикладене, можна припустити, що збільшення амплітуди гіперкалієвої контрактури за низьких концентрацій токсину зумовлено переважно додатковим входом іонів  $Ca^{2+}$  до міоплазми.

Як свідчать викладені вище результати експериментів, СТ впливає на потенціалкеровані механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ГМК. З літератури [15, 16]

Параметри амплітуди ( $f_m$ ), часу ( $\tau_0$ ), швидкості ( $\kappa_c$ ) індукованих кофеїном скорочень гладеньком'язових смужок *saesit* морських свинок та швидкості їхнього розслаблення ( $\kappa_p$ ) у присутності токсину стафілокока в концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6} - 1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх

Показник	Концентрація стафілококового токсину, Лх					
	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-1}$
$\kappa_c$ , відн. од.	$2,6 \pm 0,18$	$1,9 \pm 0,12$	$1,8 \pm 0,12$	$1,6 \pm 0,06$	$1,7 \pm 0,10$	$2,6 \pm 0,20$
$\kappa_p$ , відн. од.	$1,7 \pm 0,10$	$2,0 \pm 0,16$	$1,4 \pm 0,08$	$4,4 \pm 0,39$	$1,9 \pm 0,13$	$1,6 \pm 0,10$
$f_m$ , мН	$0,895 \pm 0,02$	$0,863 \pm 0,01$	$0,630 \pm 0,03$	$0,525 \pm 0,08$	$0,810 \pm 0,01$	$0,675 \pm 0,04$
$\tau_0$ , с	$13,13 \pm 0,91$	$11,25 \pm 1,33$	$11,25 \pm 0,78$	$11,25 \pm 0,86$	$12,94 \pm 1,04$	$12,94 \pm 0,97$

відомо, що, крім потенціалкерованих, є також рецепторкеровані механізми регуляції  $[Ca^{2+}]_i$ . У зв'язку з цим ми вивчали вплив СТ різних концентрацій на скорочення ГМС *saesum*, викликані агоністом мускаринових рецепторів (МР) ацетилхоліном. Доказом дії цієї речовини на мускаринові рецептори була конкурентна блокада ефекту агоніста атропіном ( $10^{-6}$  М). Мускаринові рецептори належать до родини 7-ТМ рецепторів, які активують G-білки. У гладеньких м'язах МР представлені підтипами  $M_2$  та  $M_3$ . Відомо, що активація  $M_3$  холінергічних рецепторів активує гідроліз фосфатиділінозиту, що призводить до утворення інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ), який викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  з ІТФ-чутливої частини СР [16]. Це проявляється у вигляді швидкої фазної компоненти скорочення, яке виникає у відповідь на аплікацію агоніста [15, 18]. Фазна компонента переходить у тонічну, як вважають автори роботи [19], зумовлену взаємодією ацетилхоліном з  $M_2$ -рецепторами (вони становлять біля 80 % загальної кількості МР [17]). Однією з ланок складних перетворень, які мають місце під час передачі сигналу від  $M_2$ -рецепторів до скоротливого апарату в ГМК, є вхід  $Ca^{2+}$  по потенціалкерованих кальцієвих каналах L-типу до міоплазми та наступне  $Ca^{2+}$ -індуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  з ріанодинчутливої частини СР [15]. У наших дослідях під дією СТ у концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-6}$  та  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх зменшувалася як фазна, так і тонічна компоненти викликаного ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М) скорочення (рис. 4, а, б). Як видно з рис. 4, у кількісному відношенні ефект, спричинений СТ на обидві компоненти скорочення, був практично однаковим, що вказує на блокування проведення сигналу агоніста по обох фармако- і електромеханічному шляхах спряження скорочення—збудження, функціонування яких не є взаємозалежним. Так, вважають [15, 18], що холінергічно активовані  $M_3$ -рецептори контролюють відкриття максимальної кількості активованих катіонних каналів у плазматичній мембрані ГМК, при цьому відомо, що активація і першого, і другого шляхів проведення сигналу обмежується розвитком кальційзалежних калієвих струмів, а також затриманого в часі інактивацією ІТФ-індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР.

У наступній серії дослідів вивчали вплив СТ на дозалежні криві: амплітуда скорочення ГМС— $(-lg[AX])$ . Встановлено, що  $EC_{50}$  (концентрація ацетилхоліну, при якій досягається 50 % максимального скорочення) для залежності  $lg[AX]$ —амплітуда скорочення становила  $(5 \pm 1,02) \cdot 10^{-6}$  М ( $n = 7$ ) (рис. 5). Цей показник у присутності токсину зміщувався в бік більших концентрацій аце-

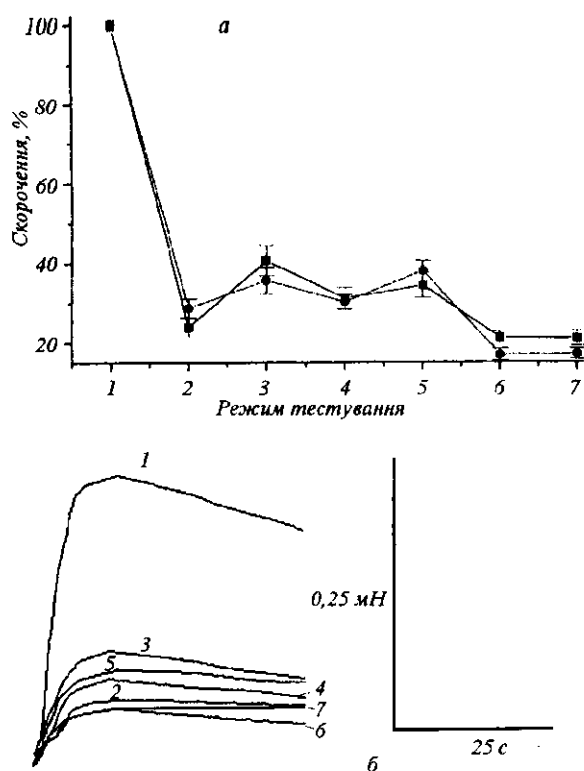


Рис. 4. Вплив стафілококового токсину на фазну і тонічну компоненти викликаного ацетилхоліном скорочення гладеньком'язових смужок *saesum* морських свинок: а: 1 — контроль; аплікація стафілококового токсину в концентрації: 2 —  $1,6 \cdot 10^{-6}$ ; 3 —  $1,6 \cdot 10^{-5}$ ; 4 —  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ; 5 —  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ; 6 —  $1,6 \cdot 10^{-2}$ ; 7 —  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх (I — фазна і II — тонічна компоненти скорочення); б: фактичні експериментальні криві: 1 — контроль; аплікація стафілококового токсину в концентраціях: 2 —  $1,6 \cdot 10^{-6}$ ; 3 —  $1,6 \cdot 10^{-5}$ ; 4 —  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ; 5 —  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ; 6 —  $1,6 \cdot 10^{-2}$ ; 7 —  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх

тилхоліну стосовно контрольного значення, наведеного вище, дорівнюючи, наприклад,  $(4,68 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$ ,  $(1,90 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$  М ( $n = 7$ ) для концентрацій СТ  $1,6 \cdot 10^{-5}$  та  $1,6 \cdot 10^{-4}$  Лх відповідно. Для пояснення отриманих результатів було зроблено припущення щодо неконкурентного механізму пригнічення СТ викликаних ацетилхоліном скорочень. Аналіз результатів експериментів за методом Хантера-Даунса [20] показав, що взаємодія СТ з холінергічними рецепторами ГМК носить складний характер, опис якого не вкладається в рамки відомих у кінетиці підходів.

Таким чином, отримані результати свідчать

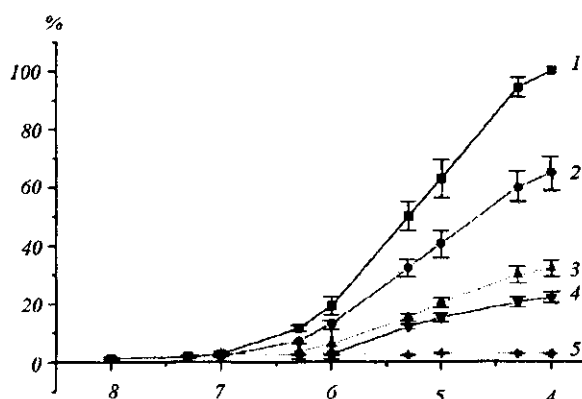


Рис. 5. Криві доза—ефект, отримані на гладеньком'язових смужках caecum морських свинок при аплікації ацетилхоліну у відсутності (1) та в присутності токсину стафілокока в концентраціях  $1,6 \cdot 10^{-5}$  (2);  $1,6 \cdot 10^{-2}$  Lh (3);  $1,6 \cdot 10^{-1}$  (4) Lh; 5 — Ig [AX]. По осі ординат — скорочення

про те, що однією з мішеней при враженні організму СТ є гладенькі м'язи кишково-шлункового тракту. Основним механізмом, за яким здійснюється модуляція скоротливої активності ГМК за даних умов, є вплив СТ як на потенціал-, так і на рецепторкеровані механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

T. L. Davidovskaya, O. V. Tsimbalyuk, M. S. Miroshnichenko

Staphylococcus toxin modulates the regulatory mechanisms of contraction-relaxation of ring smooth muscles of the thick intestine

#### Summary

*Summary* The influence of staphylococcus toxin (ST) of concentration  $1,6 \cdot 10^{-6}$ — $1,6 \cdot 10^{-1}$  Lh on the contractile activity of thin (150—200  $\mu\text{m}$ ) smooth muscle stripes from guinea pig caecum caused by acetylcholine or high potassium solution and caffeine has been studied. It has been found that ST changes the permeability of L-type Ca channels dose-dependently and inhibits the caffeine-induced contraction of muscle stripes. ST modulates the realisation of a neurotransmitter signal along the electrical and pharmacomechanical ways of excitation-contraction coupling in smooth muscle cells.

T. L. Давидовская, О. В. Цимбалюк, Н. С. Мирошниченко

Токсин стафілококка модулює регуляторні механізми скорочення—расслаблення кільцевих гладких м'язів товстого кишечника

#### Резюме

*Исследовали* влияние токсина стафилококка в концентрациях  $1,6 \cdot 10^{-6}$  —  $1,6 \cdot 10^{-1}$  Лх на сократительную активность тонких (150—200 мкм) гладкомышечных полосок caecum морских

свинок, вызванную действием нейромедиатора ацетилхолина, а также аппликацией гиперкалиевого раствора и кофеина. Установлено, что токсин стафилококка дозозависимо изменяет проводимость потенциалуправляемых кальциевых каналов L-типа, ингибирует индуцированные кофеином сокращения гладкомышечных полосок. Это вещество модулирует проведение сигнала агониста по электро- и фармакохимическому путям от рецепторов до эффектора в гладкомышечных клетках.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Красильников О. В., Терновский В. И., Ташмухамедов Б. А. Свойства каналов проводимости индуцируемых в бислоиных фосфолипидных мембранах  $\alpha$ -стафилококсом // Биофизика.—1981.—26, № 2.—С. 271—275.
2. Чеферна И., Кадмек О., Мачек К., Гулота О. Механизмы действия стафилококкового альфа-токсина на мочеточник морской свинки при исследованиях по методу GAP с сахарозой // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1974.—8, № 3.—С. 270—274.
3. Krastilnicov O. V., Merzlyak P. G., Yuldasheva L. N., Rodrigues C. G., Noguera R. A. Heparin influence on  $\alpha$ -staphylococcal toxin formed channel // Biochim. et biophys. acta. Biomembranes.—1999.—1417, N 1.—P. 167—182.
4. Ворновицкий В. Г., Игнатъева В. Б., Пашутин С. Б., Белоцкий С. М. Влияние стафилококкового токсина и его комплекса с антистафилококковым гамма-глобулином на электрическую и сократительную активность миокарда морской свинки // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1983.—96, № 10.—С. 16—19.
5. Бриль Е. Г. Влияние стафилококкового токсина на кальцийтранспортирующие системы сердечной мышцы // Пат. физиология и эксперим. терапия.—1985.—№ 4.—С. 15—18.
6. Бухарова Т. Б., Бейлбаева М. Л., Езепчук Ю. В. Взаимодействие стафилококкового  $\alpha$ -токсина с биомембранами // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1990.—№ 8.—С. 3—4.
7. Olofsson A., Kaeus U., Hebert H. The structure of oligomeric  $\alpha$ -toxin Staphylococcus aureus in human platelet membranes // EUREM 88: Proc. 9<sup>th</sup> Eur. Congr. Electron. Microsc. (New York, 4—9 Sept., 1988).—Bristol, 1988.—P. 397—398.
8. Lala Anil K., Raja Srikumar M. Photolabeling of a pore-forming toxin with the hydrophobic probe 2-[<sup>3</sup>H] diazofluorescence. Identification of membrane-inserted segments of Staphylococcus aureus  $\alpha$ -toxin // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 19.—P. 11348—11357.
9. Бриль Г. Е. Механизмы влияния стафилококкового токсина на сердце // Пат. физиологии и эксперим. терапия.—1988.—№ 6.—С. 45—48.
10. Русанова Е. В. Изменение гемолитической активности стафилококковых  $\gamma$ - и  $\alpha$ -токсинов при взаимодействии с тканями органов и экспериментальных животных in vitro // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1973.—8.—С. 81—84.
11. Пастер Е. У., Чеусова З. В., Вершигора А. Е. Токсины стафилококка // Стафилококк / Под ред. В. В. Смирнова, А. Е. Вершигоры.—К.: Наук. думка, 1988.—С. 14—34.
12. Костерин С. А., Бурдыга Ф. В. Кинетический анализ процесса сокращения-расслабления гладких м'язів // Биофизика.—1990.—35, № 2.—С. 350—355.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. школа, 1990.—352 с.
14. McDonald T. F., Pelzer S., Fraitwein W., Pelzer D. J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac skeletal and smooth cells // Physiol. Revs.—1994.—74, N 2.—P. 365—507.

15. Жолос О. В. Мембранні та внутрішньоклітинні механізми М-холінергічної активації гладеньком'язових клітин тонкого кишечника: Дис. ... д-ра. біол. наук.—Київ, 1999.—278 с.
16. Kochemasova N. G., Shuba M. F. Possible ways of extracellular calcium influx necessary for indication of contraction // *Physiol. and Pharmacol. of Smooth Muscle: Abstrs. of papers.*—Varna: Publ. house Bulg. Acad. Sci., 1979.—P. 44.
17. Bolton T. B., Zim S. P. Properties of calcium stores and transient outward currents in single smooth muscle cells of rabbit intestine // *J. Physiol.*—1989.—409.—P. 385—401.
18. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference of receptors and ion channels // *Physiol. Revs.*—1998.—78, N 3.—P. 811—920.
19. Somlyo A. V., Bond M., Somlyo A. P., Scarpa A. Inositol triphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82.—P. 5231—5235.
20. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика.—К.: Вища школа, 1977.—264 с.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 10.05.2000