

## Пептидогликан змінює механічні властивості стінок судин еластичного типу

І. Б. Філіппов<sup>1</sup>, Т. Л. Давидовська, Л. П. Савінайнен, М. Ф. Шуба<sup>1</sup>, В. К. Позур

Київський університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України  
Вул. Богомольця, 4, Київ, 01024, Україна

*Показано, що пептидогликан (ПГ) золотистого стафілокока знижує рівень базального тону аорти, не гальмуючи входу іонів кальцію в гладеньком'язові клітини через потенціалзалежні та рецепторкеровані кальцеві канали плазматичної мембрани і не змінюючи вивільнення цих катіонів з внутрішньоклітинних запасників. Як з'ясовано, зміна механічних властивостей кондуктивних судин під дією ПГ обумовлена його впливом на властивості міжклітинного сполучнотканинного матриксу, що супроводжується зменшенням генеруючої ним напруги, модуля Юнга та збільшенням термоіндукованих реакцій. Білок А не впливає на рівень базального та викликаного тону судин як еластичного, так і м'язового типу.*

Вступ. Хвороби стафілококової етіології по значенню в інфекційній патології займають одне з перших місць. Вивчення патогенезу ряду захворювань з високою летальністю (менінгіт, постабортівний сепсис, токсичні диспепсії, перитоніти та ін.), що спричиняються дією цих бактерій і, зокрема, найпатогеннішими з них — *Staphylococcus aureus*, показало, що їхня фізіологічна активність обумовлена не тільки впливом на органи та тканини токсинів, але і його активних субстанцій — білка А (БА) та пептидогликану (ПГ) [1]. Застосування сучасних фізико-хімічних та імунологічних методів дослідження дозволило встановити хімічний склад та фізичні характеристики цих макромолекул. Так, БА, який знаходиться в зовнішніх шарах клітинної стінки [2], його цитоплазмі [3] і може виявлятися в культуральному середовищі [4], має молекулярну масу 42 кДа [5]. Це значення може варіювати й залежить від чистоти препарату, методів його отримання [6]. Значення коефіцієнту седиментації БА коливається від 1,26 до 2,60, ізоелектрична риска — в межах рН 7,4—8,6. Фрикційне співвідношення становить 2,1–2,2, а характеристична

в'язкість  $2,95 \cdot 10^{-2} \text{ м}^3 \cdot \text{кг}^{-1}$  [7], що згідно з розрахунками коефіцієнта Сімхи відповідає формі макромолекули у вигляді подовженого еліпсу. Каркас бактеріальної стінки *S. aureus* складають молекули ПГ [8, 9]. До його складу входять амінокислоти L- та D-конфігурації [10]. Аміноцукри N-ацетилглюкозамін та N-мурамова кислота повторюються, утворюючи гліканові одиниці. Молекулярна маса ПГ становить від 20 до 80 кДа. На величину цього показника впливає ступінь його полімеризації.

У попередніх наших дослідженнях [11] було показано, що БА та ПГ пригнічують скорочувальні відповіді гладеньком'язових клітин (ГМК) міометрію та шлунку на аплікацію ацетилхоліну. Вплив цих речовин на скорочення здійснюється за принципом неконкурентного пригнічення за рахунок підсилення кальційзалежної калієвої провідності мембрани ГМК. Отже, безпосередня дія БА та ПГ може бути однією з причин порушення функцій вісцеральних гладеньких м'язів (ГМ) при стафілококовій інфекції.

Інфікуванню піддаються не тільки ГМ вісцеральних органів, але й, згідно з публікаціями останніх років [12—14], судини. Наприклад, бактеріальні ентеротоксини в різних клітинах, у тому числі й судин, призводять до запуску L-аргінинзалежного внутрішньоклітинного синтезу оксиду

© І. Б. ФІЛІППОВ, Т. Л. ДАВИДОВСЬКА, Л. П. САВІНАЙНЕН,  
М. Ф. ШУБА, В. К. ПОЗУР, 2000

азоту (NO), стимулюючи NO-синтазу. Оксид азоту, в свою чергу, викликає підвищення рівня cGMP [15] — головного фактора, що асоціює з гіпорективністю в кондуктивних і резистивних артеріях до вазоактивних реагентів. Існують також дані про те, що холерний токсин може *in vitro* обернено викликати скорочення сіток із колагену I типу [16]. Враховуючи вищенаведене, мета представленої роботи полягає в з'ясуванні механізму впливу БА та ПГ стафілокока на механічні властивості судин еластичного (аорта, легенева артерія) та м'язового (мезентеріальна й хвостова артерії) типів.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили на судинних препаратах щурів: аорта, легенева, мезентеріальна й хвостова артерії. Препарати готували двох типів — повздожні та кільцеві. Судинні смужки кондуктивних артерій прикріплювали одним кінцем до датчика сили, а другим — до генератора механічних деформацій. Початкову довжину смужки ( $L_{\text{поч}}$ ) визначали у відповідності з [17]. Механічне напруження ( $\sigma$ ) та жорсткість ( $S$ ) смужки вимірювали в ізометричному режимі при довжині  $1,2 L_{\text{поч}}$  [18] спочатку в діапазоні температур від 20 до 40 °С. Потім скоротливий апарат ГМК пригнічували інгібіторами клітинного метаболізму [19] та досліджували механічні властивості сполучнотканинного матриксу (СТМ) при температурах, вказаних вище. В дослідках на резистивних судинах використовували устаткування й методику згідно з [20]. Сигнали реєстрували на папері за допомогою самозаписуючого потенціометра. Перед кожним дослідом гладеньком'язові препарати витримували в робочій камері протягом 60 хв, де їх омивали розчином Кребса наступного складу (мМ): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaHCO<sub>3</sub> — 15,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,2; MgCl<sub>2</sub> — 1,2; CaCl<sub>2</sub> — 2,5; глюкоза — 11,5; рН розчину підтримували на рівні 7,4. Номінально безкальцієвий розчин Кребса містив еквімолярну кількість MgCl<sub>2</sub> замість CaCl<sub>2</sub>. БА та ПГ заданої концентрації вносили в розчин Кребса, яким омивали препарати, за 30 хв до вивчення механічних скорочень, викликаних фізіологічно активними речовинами.

У дослідках застосовували БА (штам *S. aureus* Cowan I), кофеїн (20 мМ), йодацетат (2 мМ), 2,4-динітрофенол ( $10^{-5}$  М), прокаїн ( $5 \cdot 10^{-3}$  М), ніфедипін ( $10^{-5}$  М), фенілефрин ( $10^{-6}$ — $10^{-4}$  М), серотонін креатинфосфат ( $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М), ацетилхолін ( $10^{-9}$ — $10^{-4}$  М). Усі речовини були виробництва фірми «Sigma» (США). Ізоосмотичність безкальцієвого, безмагнієвого розчину Кребса, до складу якого входили інгібітори клітинного метаболізму, але не входила глюкоза, встановлювали за допомогою NaCl.

ПГ отримували за відомою методикою [11], використовуючи штаб *S. aureus* 2887.

Результати експериментів статистично обробляли за загальноприйнятою методикою.

**Результати і обговорення.** У першій серії дослідів вивчали вплив БА та ПГ на викликані дією медіаторів та фізіологічно активних речовин (норадреналіну, ацетилхоліну, серотоніну, фенілефрину) на укорочення мезентеріальної, хвостової, легеневої артерій та аорти щурів. Відомо, що в активації даних відповідей беруть участь іони Ca<sup>2+</sup>, які входять у ГМК через рецепторкеровані та потенціалкеровані кальцієві канали [21]. Як показали результати експериментів, досліджувані речовини не впливають на фармакомеханічне та електромеханічне спряження під час скорочення судинних препаратів.

Враховуючи вищенаведені результати, у подальших дослідках вивчали вплив ПГ та БА на рівень базального тону судин еластичного (аорта, легенева артерія щурів) та м'язового (мезентеріальна й хвостова артерії щурів) типів. Останні відрізняються значною кількістю ГМК по відношенню до еластичної стромы, яка складає міжклітинний СТМ [22]. Встановлено, що БА не впливає на базальний тонус судинних смужок грудного відділу та дуги аорти, тоді як ПГ у концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-2}$  мг/мл викликає дозозалежне розслаблення препаратів (рис. 1). Розслаблення, спричинене максимально ефективною концентрацією ПГ ( $5 \cdot 10^{-5}$  мг/мл), було на 25 % менше розслаблення в номінально безкальцієвому розчині Кребса (рис. 2, а, б). На фоні дилатації у безкальцієвому розчині або при блокуванні потенціалзалежних кальцієвих каналів мембрани ГМК ніфедипіном ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) чи іонами Co<sup>2+</sup> ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) ПГ викликає додаткове розслаблення, величина якого в обох випадках мало різнилась (рис. 2, в). Подальші дослідження викликаних аплікацією фенілефрину, норадреналіну, серотоніну скорочень судинних препаратів аорти та мезентеріальної артерії щурів у присутності БА та ПГ у нормальному, безкальцієвому, а також у гіперкалієвому розчинах Кребса показали, що амплітуда та форма кривих скорочення залишилися незмінними в порівнянні з контролем. Таким чином, було виявлено відмінності у впливі БА та ПГ на рівень базального тону аорти і повну або часткову відсутність здатності цих речовин змінювати його у мезентеріальної та хвостової артеріях щурів, з одного боку, і не виявлено гальмування або потенціювання входу іонів Ca<sup>2+</sup> у ГМК аорти через потенціалзалежні та рецепторкеровані канали плазматичної мембрани, з другого.

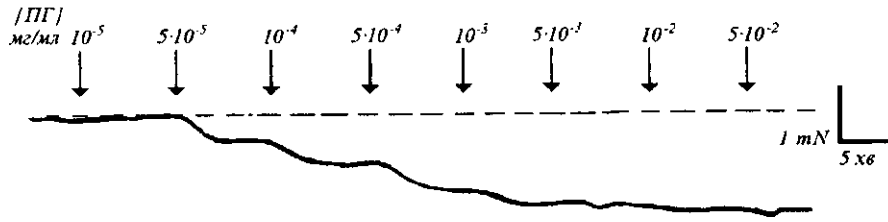


Рис. 1. Розслаблення м'язового препарату аорти щура під дією різних концентрацій пептидоглікану (ПГ). Пунктирною лінією позначено вихідну напругу м'язового препарату

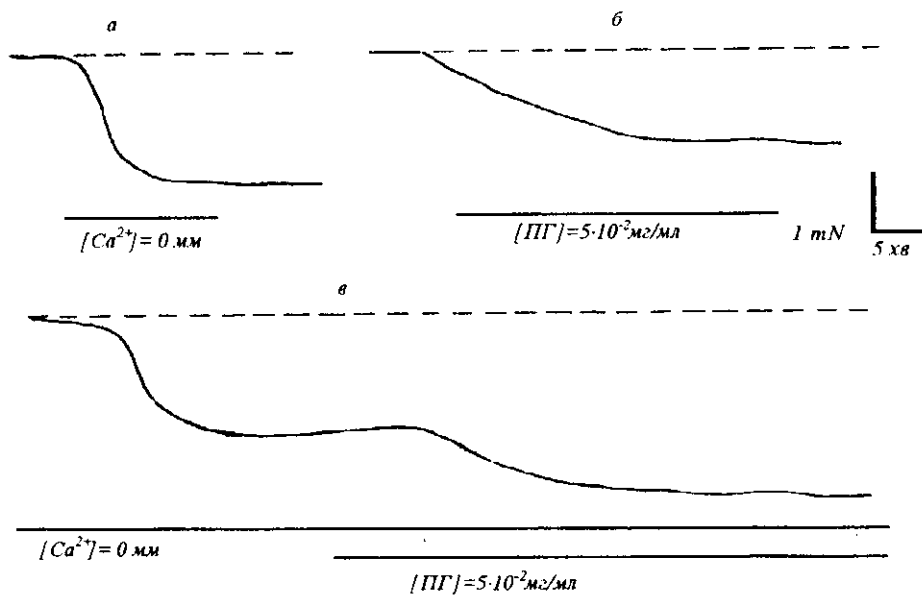


Рис. 2. Розслаблення м'язового препарату аорти щура, викликане дією безкальцієвого розчину Кребса (а) і пептидоглікану (ПГ) (б) у нормальному розчині Кребса. Скоротливі реакції аорти щура (в) у безкальцієвому розчині Кребса в присутності ПГ ( $5 \cdot 10^{-2}$  мг/мл). Пунктирною лінією позначено вихідну напругу м'язового препарату; безперервною — тривалість дії безкальцієвого розчину і ПГ

Розслаблення судинних ГМ після дії медіаторів та фізіологічно активних речовин може бути обумовлено стимуляцією вивільнення кальцію з ГМК і збільшенням захоплення його внутрішньоклітинними запасниками. Однак вони можуть викликати розслаблення і без зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію шляхом зниження спорідненості кінрази легких ланцюгів міозину до комплексу кальцій—кальмодулін. Блокування кофеїнчутливих кальцієвих каналів саркоплазматичного ретикулулу ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) або множення кофеїнчутливих кальцієвих джерел кофеїном (20 мМ) у комплексі з використанням інгібітора мітохондріального метаболізму 2,4-динітрофенолу ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) показало, що релаксуюча здатність ПГ залишилася

незмінною. Такий результат було отримано і при повній інактивації скоротливого апарату ГМК аорти.

Отже, проведені дослідження дають підставу стверджувати, що ПГ не впливає на базальний тонус, основою якого є міогенна автоматія (спонтанні скорочення) гладеньком'язових судинних клітин, а також на викликаний тонус, що формується скороченням ГМК, які стимулюються різними зовнішніми щодо м'язових клітин подразниками.

У формуванні загального судинного тонусу судин еластичного типу беруть участь не тільки ГМК судин, але й міжклітинний СТМ завдяки притаманній йому властивості генерувати механічну на-

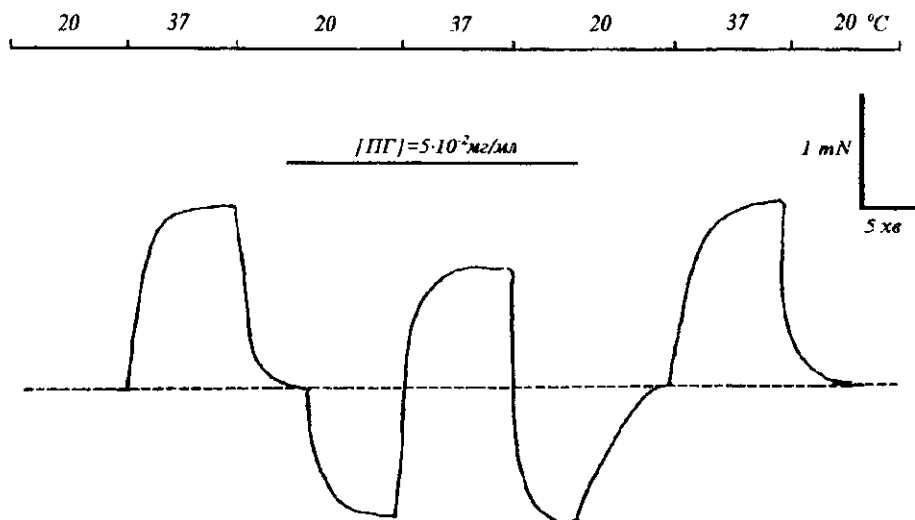


Рис. 3. Вплив пептидоглікану (ПГ) на термоіндуковані скорочення аорти щура з інактивованим скоротливим апаратом гладеньком'язових клітин. Пунктирною лінією позначено вихідний рівень напруги препарату аорти

пругу. Виходячи з цього було зроблено припущення, що ПГ може зв'язуватися з колаген-глікозамін-глікан-еластинним комплексом міжклітинного матриксу судинної стінки і тим самим змінювати його механічні властивості. Скорочувальні функції в цьому комплексі виконує тривимірна сітка фібрил колагену I—III типів, суть яких визначається механохімічними реакціями комплексу цих колагенів у відповідь на дію фізико-хімічних факторів зовнішнього середовища (температура, іонне оточення тощо) [23, 24]. Для вивчення впливу ПГ на пасивні механічні параметри СТМ експерименти здійснювали на препаратах аорти щурів з інактивованими інгібіторами клітинного метаболізму (йодацетат, 2 мМ; 2,4-динітрофенол, 2 мМ у безкальцієвому розчині Кребса, де була відсутня глюкоза та іони магнію, в присутності 20 мМ кофеїну) скоротливим апаратом ГМК. При цьому в кожному досліді реєстрували жорсткість і продукуючу ними напругу на дію температури в діапазоні значень від 20 до 37 °С (рис. 3). Було з'ясовано, що, зв'язуючись з СТМ, ПГ зменшує ступінь гідратованості колаген-глікозамінглікан-еластинного комплексу і тим самим змінює механічні властивості й термо-стабільність колагену. Характерною ознакою цього є, по-перше, зменшення модуля Юнга на 22 %, а напруги — на 13 % і, по-друге, збільшення термоіндукованих реакцій майже на 15 % відносно норми. Таким чином, вплив ПГ на судинний тонус

стілки артерій еластичного типу проявляється внаслідок його адгезивних властивостей, що є можливим первинним механізмом його дії. Можна припустити, що ця його здатність призводить до змін у кардіо- та гемодинаміці організму під час стафілокової інфекції за рахунок модуляції нейрогуморальних регуляторних механізмів. Останнє є результатом зміни пасивних механічних властивостей судинних стінок. Подальше вивчення цих питань видається важливим, оскільки дозволить наблизитися до розуміння патогенезу захворювань, викликаних стафілоковою інфекцією.

Робота виконана при фінансовому сприянні Державного фонду фундаментальних досліджень Міністерства України у справах науки і технологій (проект N 5.4/440).

И. Б. Филиппов, Т. Л. Давидовская, Л. П. Савинайнен, М. Ф. Шуба, В. К. Позур

Пептидогликан изменяет механические свойства стенок сосудов эластического типа

Резюме

Показано, что пептидогликан (ПГ) золотистого стафилококка снижает уровень базального тонуса изолированных препаратов аорты крысы (артерий эластического типа), не тормозя входа ионов кальция в гладкомышечные клетки через потенциалзависимые и рецепторуправляемые кальциевые каналы плазматической мембраны и не изменяя освобождения этих катионов из внутриклеточных запасников. Как установлено, изменение механических свойств стенки аорты под действием ПГ

обусловлено его влиянием на межклеточный соединительнотканый матрикс, что сопровождается уменьшением пассивного напряжения, модуля Юнга и увеличением термоиндуцированных реакций. ПГ не изменял базального тонуса и механических свойств препаратов хвостовой артерии крысы (артерия мышечного типа). Белок А, изолированный из клеточной стенки золотистого стафилококка, не влиял на уровень базального тонуса артерий как эластического, так и мышечного типа.

I. B. Philippov, T. L. Davidovskaya, L. P. Savinaynen, M. F. Shuba, V. K. Pozur

Peptidoglycan changes mechanical properties of vessel's walls of elastic type

#### Summary

It has been shown that peptidoglycan (PG) of the golden staphylococcus decreases the basal tone of rat aortic strips (artery elastic type) not influencing on the input of the calcium ions into the smooth muscle cells through the potential-dependent and receptor-operated calcium channels of the plasma membrane and not changing the release of this cations of the intracellular stores. It has been definitely established that the changing in the mechanical properties of the aortic walls under the PG influence are due to their acting upon the connective tissue matrix, which is accompanied by the reducing of passive tension, Young modulus and the increase of the thermoinduced reactions. PG does not influence the basal tone and the mechanical properties of the rat tail artery (artery muscular type). The protein A isolated from cell walls of golden staphylococcus does not influence the basal tone of the arteries of both elastic and muscular types.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Акатов А. К., Зуева В. Ф. Стафилококки.—М.: Медицина.—1983.—205 с.
- Каулен Д. Р., Холодная Л. С., Хоробрых В. В., Марченко В. П. Особенности действия стафилококковых антигенов на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов селезенки интактных морских свинок // Иммунология.—1981.—№ 4.—С. 43—47.
- Толовская К. Р., Акатов А. К. Очистка протективного стафилококкового антигена // Журн. микробиологии.—1974.—№ 2.—С. 83—89.
- Movitz J. Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus* // Eur. J. Biochem.—1976.—68, N 1.—P. 291—299.
- Bjork J., Petersson B., Sjogvist J. Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus* // Eur. J. Biochem.—1972.—29, N 3.—P. 579—584.
- Вершигора А. Е., Холодная Л. С. Иммунобиологическая активность белка А стафилококка // Успехи соврем. биологии.—1986.—101, № 3(б).—С. 449—461.
- Sjogvist J., Molout B., Hjelm H. Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin // Eur. J. Biochem.—1972.—29, N 3.—P. 572—579.
- Акатов А. К. Антигенная структура *Staphylococcus aureus* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1975.—№ 10.—С. 55—62.
- Krause R. M. Immunological activity of the peptidoglycan // Z. Immunitatsforsch.—1975.—149, N 2/4.—P. 136—150.
- Schleifer K. H. Chemical structure of the peptidoglycan in modifiability and relation to the biological activity // Z. Immunitatsforsch.—1985.—148, N 2/4.—P. 104—125.
- Филиппов И. Б., Шуба М. Ф., Давидовская Т. Л., Холодная Л. С., Позур В. К., Любченко Т. А. Влияние активных субстанций золотистого стафилококка (белка А и пептидогликана) на сокращение гладких мышц, вызванное действием нейромедиаторов // Нейрофизиология.—1996.—28, № 1.—С. 30—35.
- Wheeler E. C., Brenner Z. R. Peripheral vascular anatomy, physiology and pathophysiology // AACN Clin. Issues.—1995.—6, N 4.—P. 505—514.
- Stoclet J.-C., Fleming I., Gray G., Julou-Schaeffer G., Schneider F., Schott C., Schoot Ch., Parratt J. Nitric oxide and endotoxemia // Circulation.—1993.—87, N 5.—P. V77—V80.
- Schneider F., Schott C., Stoclet J.-C., Julou-Schaeffer C. L-arginine induced relaxation of small mesenteric arteries from endotoxin treated rats // Eur. J. Pharmacol.—1992.—211.—P. 269—272.
- Shuller F., Fleming I., Stoclet J.-C., Gray G. A. Effect of endotoxin on circulating cyclic GMP in the rat // Eur. J. Pharmacol.—1992.—212.—P. 93—96.
- Chen J.-K., Li S.-R., Tsoi R. J.-F. Cycle AMP-induced inhibition of collagen lattice contraction by fibroblasts may be attenuated by both cyclic AMP dependent and independent mechanisms // J. Cell Physiol.—1993.—155, N 1.—P. 8—13.
- Pawlowski J., Morgan K. Mechanism of intrinsic tone in ferret vascular smooth muscle // J. Physiol.—1992.—448.—P. 121—132.
- Kamm K. E., Stull J. T. Activation of smooth muscle contraction. Relation between myosin phosphorylation and stiffness // Science.—1986.—232.—P. 80—82.
- Lowy L., Stull J. T. Mechanical properties of quinea pig taenia coli muscles // Acta Physiol. Scand.—1983.—88.—P. 123—136.
- Mulvani M. J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // Circul. Res.—1977.—41.—N 1.—P. 19—26.
- Ito Y., Kitamura K., Kuriyama N. Effect of acetylcholine and catecholamines on the smooth muscle of the porcine coronary artery // J. Physiol.—1979.—294.—P. 595—611.
- Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. Физиология сосудистых гладких мышц.—Киев: Наук. думка, 1988.—252 с.
- Філіппов І. Б., Савінайнен Л. П. Вплив іонної сили розчину на термомеханічні властивості сполучнотканинного матриксу стінки аорти // Тези доп. I-го з'їзду УБФТ.—Київ, 1994.—С. 240.
- Хєстанєв С. О., Філіппов І. Б. Питома механічна термо-чутливість стінки аорти і її актоміозинний та неактоміозинний компонент // Тези доп. I-го з'їзду УБФТ.—Київ, 1994.—С. 243.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 07.10.98