

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ .

На правах рукописи

АЗИН
АЛЕКСАНДР ЛЕОНИДОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ
СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ
АРТЕРИЙ МОЗГА**

(14.00.17— нормальная физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Свердловск
1974

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

АЗИН
АЛЕКСАНДР ЛЕОНИДОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ
СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ
АРТЕРИЙ МОЗГА

(14.00.17— нормальная физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Свердловск
1974

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии
Свердловского Государственного медицинского института.

Научный руководитель — доктор медицинских наук,
профессор *ОРЛОВ Р. С.*

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор *МОСКАЛЕНКО Ю. Е.*

доктор медицинских наук, профессор *ШАБУНИН Р. А.*

На внешний отзыв работа направлена в Институт экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР,
г. Ленинград.

Автореферат разослан « *23* » *января* 1975 г.

Защита диссертации состоится « *25* » *февраля* 1975 г.
на заседании медико-биологического Ученого Совета Свердловского Государственного медицинского института.

Адрес: г. Свердловск, ул. Репина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Свердловского Государственного медицинского института.

Адрес: г. Свердловск, ул. Ермакова, 17.

Ученый секретарь Совета — доцент *КОНСТАНТИНОВ В. Г.*

В современной физиологии и практической медицине одной из актуальных задач является исследование механизмов регуляции мозгового кровообращения. По данным Всемирной организации здравоохранения сосудистые заболевания мозга являются чрезвычайно распространенными и входят в число первых трех причин смертности. Показатели летальности от различных форм патологии сосудов мозга достигают 11,3 %, уступая лишь ишемической болезни сердца и злокачественным новообразованиям *.

Рост cerebro-vasкулярных расстройств, нередко приводящих пациентов к трагическому исходу, обязывает к углубленному и систематическому изучению сложнейших циркуляторных феноменов, возникающих в головном мозгу в норме и при разнообразных патологических условиях. Немаловажная роль в решении этой проблемы принадлежит анализу физиологических закономерностей сосудистых механизмов, выявленных в эксперименте.

В литературе имеется ряд отечественных (Клосовский, 1951; Мchedlishvili, 1968; Науменко и др., 1970; Москаленко и др., 1971a) и зарубежных (Fog, 1939 a, в; Kety, 1960; Purves, 1972) сообщений, систематизирующих результаты исследований по изучению регуляторных механизмов кровоснабжения мозга. В этих работах, содержащих, в основном, данные о системных и регионарных рефлекторных реакциях сосудов головного мозга, имеются указания и на то, что многие факторы способны непосредственно активировать мускулатуру мозговых сосудов. В экспериментах на интактных животных и в опытах с перфузией показано, что изменение газового состава крови, содержания электролитов, гормонов, медиаторов и ряда других промежуточных продуктов обмена оказывает прямое действие на тонус мозговых артерий (Мchedlishvili, 1968; Кедров, 1970).

Однако в литературе имеется крайне мало сведений о физиологических свойствах самих гладкомышечных элементов мозговых сосудов, реакции которых, в конечном счете, определяют степень активности артериальной системы данного отдела. Остаются невыясненными особенности активации возбудимой

*) Доклад совещания Всемирной организации здравоохранения: «Сосудистые заболевания мозга: предупреждение, лечение и реабилитация», № 469, Женева, 1973.

системы клеток гладких мышц сосудов мозга, практически не изучены процессы электромеханической ювязи, осуществляемые ионами кальция. Не известна природа клеточных механизмов ауторегуляции, а также пути и способы прямого влияния целого ряда гормонов и медиаторов на сократительную деятельность сосудистых гладких мышц.

В связи с этим в настоящей работе были поставлены следующие задачи: 1) изучить роль поверхностных мембран гладкомышечных клеток крупных артерий мозга в механизмах активации сократительного аппарата; 2) исследовать природу электромеханической ювязи и роль ионов кальция в регуляции сократительного процесса клеток гладких мышц мозговых артериальных сосудов; 3) изучить действие сосудодобтивных физиологических факторов (адреналина, норадреналина, изопропилнорадреналина, ацетилхолина, серотонина и гистамина) на сократительную активность гладкомышечных клеток мозговых артерий.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты были проведены на мозговых артериях, выходящих из виллизиева круга у крупного рогатого юкота. Сразу же после забоя животного электротоком производилось вскрытие черепной полости и извлечение головного мозга. На его нижнебоковой поверхности выделялся крупный артериальный ствол, по своему топографическому положению относившийся к а. cerebri med. Выделенный сегмент сосуда помещался в солевой раствор Кребса (описание раствора ниже) и транспортировался в лабораторию для постановки экспериментов. Неиспользованный экспериментальный материал хранился до проведения последующих опытов в том же растворе в холодильнике при температуре $+2 - +4^{\circ}\text{C}$, но не более 48 часов после его получения. Непосредственно перед экспериментом из сосудов готовили спиральные полоски длиной 10 мм и шириной 2 мм. Концы полосок брались на лигатуры, и нерастянутые препараты помещались в рабочую камеру, заполненную раствором Кребса при температуре 36°C на 2 часа, после чего начинались экспериментальные исследования. Регистрация сократительной активности изолированной полоски сосуда производилась с помощью механотрона типа 6МХ1С. Преобразованный механотроном сигнал усиливался и регистрировался с помощью многопредельного миллиампервольтметра постоянного тока Н-373 на бумаге. Питание механотрона и усилителя осуществлялось стабилизирующим источником. Контакт датчика с препаратом производился через лигатуру, которая одним концом укреплялась на рычаге, а другим — на мышечной полоске. Противоположный конец препарата жестко фиксировался либо к раздражающему электроду, либо к рычагу растягивающего

устройства, или просто к дну камеры. Величина исходного натяжения препарата, задаваемого с помощью регулировочного винта на штативе равна 500 мг. Дрейф всей системы отведения и регистрации составил 4 мм в час. В работе использовался раствор Кребса следующего состава (в мМ): NaCl — 118; KCl — 4,7; NaHCO₃ — 14,9; KH₂PO₄ — 1,2; MgSO₄ — 1,0; CaCl₂ — 2,5; сахароза — 20,0; глюкоза — 7,8. В некоторых экспериментах использовался бескальциевый раствор, а также растворы, содержащие: адреналин гидрохлорид, норадреналин битартрат, изопропилнорадреналин гидрохлорид, ацетилхолин гидрохлорид, серотонин креатинин-сульфат, гистамин ацид-фосфат. Перечисленные фармакологические вещества добавлялись в раствор Кребса ex tempore в концентрациях от $1 \cdot 10^{-12}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. В некоторых экспериментах в эти растворы добавлялся фенотизин гидрохлорид ($1 \cdot 10^{-7}$ г/мл) и пропранолол гидрохлорид ($1 \cdot 10^{-7}$ г/мл), а также ионы марганца (MnCl₂) в концентрации 10 и 20 мМ. Действие ионов калия изучалось введением в омывающую среду гиперкалиевых растворов, содержащих (в мМ): 12,5; 25; 50; 100; 200 хлорида калия. Для работы использовались растворы, имеющие pH = 7,2 — 7,3. В ходе экспериментов в растворах поддерживалась постоянная температура равная 36°C, с пределами колебаний $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Для исследования механизма действия быстрого растяжения препаратов на сократительную активность гладкомышечных клеток в работе было использовано растягивающее устройство. Трансмуральная электрическая стимуляция проводилась прямоугольными импульсами постоянного тока, которые подавались с лабораторного стимулятора ЭСЛ — 1. Серебряные раздражающие электроды находились в солевой жидкости рабочей камеры.

Экспериментальный материал обработан статистически. Работа выполнена на 197 препаратах. В соответствии с поставленными задачами и статистической значимостью полученных результатов проведено 1035 измерений.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ МЕМБРАН В СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ГЛАДКИХ МЫШЦ МОЗГОВЫХ АРТЕРИЙ

Исследование электрофизиологических и сократительных свойств гладких мышц периферических сосудов показало, что возбудимые структуры гладкомышечных клеток контролируют функцию внутриклеточного сократительного аппарата (Holman, 1969; Орлов и др., 1971 а; Johansson, 1971; Гуревич, Берштейн, 1972; Bohg, 1973). Вместе с тем обнаружилось, что возбудимость и, следовательно, сократимость сосудистых гладких мышц могут изменяться при действии ионов калия, трансмуральной электрической стимуляции, механического растяжения — фак-

торов, способных значительно уменьшать уровень мембранного потенциала. В литературе отсутствуют данные о характере влияния деполяризующих факторов на механизмы электрогенного запуска сокращений клеток гладких мышц мозговых сосудов. В связи с этим в настоящем разделе работы поставлена задача изучить сократительную активность гладких мышц мозговых артерий в процессе использования следующих мембранных активаторов: ионов калия, быстрого растяжения, постоянного электрического тока.

1. Действие возрастающих концентраций ионов калия на сократительную активность

При замещении нормального раствора Krebsa, омывающего препарат, солевыми растворами, содержащими повышенную концентрацию хлорида калия (12,5; 25; 50; 100; 200 мМ), в препаратах исследуемых артерий обнаруживались сократительные реакции контрактурного типа, амплитуды которых градуально зависели от дозы стимулирующего агента. При действии 12,5-ммолярной концентрации КСl появлялись первые, незначительные по величине ответы. С увеличением концентрации калия во внеклеточной среде наблюдалось градуальное возрастание силы мышечных сокращений. Однако прирост амплитуды механических реакций уменьшался в области применения 100-ммолярной концентрации, и при действии 200 мМ хлорида калия мы не наблюдали более сильных сократительных ответов. Полученные результаты представлены в виде кривой «доза-ответ», а данные о величинах механического прироста — в таблице 1.

Таблица 1

Величины прироста амплитуды сократительных ответов гладких мышц мозговых артерий в зависимости от концентрации хлористого калия в наружной солевой среде (15 препаратов)

Концентрация КСl в наружной среде, (мМ):	12,5	25	50	100	200
Прирост амплитуды механического ответа, (мг):	28 ± 5	69 ± 7	71 ± 9	61 ± 8	нет прироста

При увеличении концентрации ионов калия в окружающей среде возрастала не только амплитуда сокращений, но и менялась динамика их развития. Процесс развития контрактуры при действии хлористого калия можно разделить на две компоненты: начальную — фазную и последующую медленную — тоническую. Чем выше была концентрация ионов калия в растворе, тем быстрее разворачивалась начальная фаза калийного сокращения, во всех исследованных препаратах контрактура держалась настолько долго, что мы не наблюдали полного расслаб-

ления спустя 30 и более минут после начала воздействия. Отмывание полосок нормальным солевым раствором довольно быстро возвращало мышечный тонус к исходному уровню.

2. Действие быстрого растяжения на сократительную активность

Гладкомышечные клетки исследуемых артерий оказались чувствительными к действию быстрого растяжения. В ответ на быстрые растягивающие стимулы удалось зарегистрировать в спиральных полосках активные сократительные реакции, амплитуда которых (при величине растягивающей силы 1200--1300 мг) колебалась в пределах 28 ± 2 мг ($n=16$).

3. Действие импульсного электрического тока

Использование одиночных стимулов разной амплитуды и длительности на спиральных полосках сосудов оказалось неэффективным на всех исследованных препаратах. Лишь серии воздействий с определенной частотой вызывали сокращения, амплитуда которых зависла от частоты применяемых стимулов. Результаты опытов с использованием воздействий разной частоты показали, что гладкие мышцы мозговых артериальных сосудов оказались чувствительными к электрической стимуляции, применяемой с частотой от 1 имп/сек. до 60 имп/сек. Максимум ответов по амплитуде наблюдался при частоте 40 имп/сек. Использование большей частоты стимуляции не давало прироста величины сокращений.

ПРОЦЕССЫ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЙ СВЯЗИ В КЛЕТКАХ ГЛАДКИХ МЫШЦ МОЗГОВЫХ АРТЕРИЙ

В литературе приводятся экспериментально обоснованные данные в пользу участия как внеклеточных запасов кальция в электромеханическом процессе, так и кальция, содержащегося в полостях саркоплазматического ретикулума, митохондрий, микросом и везикулярных образований плазматических мембран. Это указывает на возможность функционирования в гладких мышцах сосудов нескольких каплинг-возбуждающих механизмов. Спорным является вопрос, принадлежит ли решающая роль в активации гладкомышечного сокращения кальцию, поступающему из внеклеточной среды, либо кальцию, мигрирующему к сократительному аппарату из внутриклеточных мест хранения. В связи с этим в нашей работе изучалось влияние блокаторов кальциевой проницаемости клеточных мембран — ионов марганца на кальциевые контрактуры, а также на характер ответов, вызываемых электрической стимуляцией и быстрым

растяжением. Исследовалось также влияние бескальциевой среды на сократительную активность гладких мышц мозговых артерий до и после блокады проницаемости клеточных мембран для ионов кальция ионами марганца.

1. Влияние ионов марганца на калиевые контрактуры

В данной серии опытов регистрировались сокращения полосок срединной мозговой артерии под действием следующих концентраций ионов калия (в мМ): 12,5; 25; 50; 100; 200. На каждом препарате действие деполяризующего раствора испытывалось сначала в нормальной солевой среде, а затем в растворе, содержащем 10 или 20 мМ ионов марганца. Обнаружено, что деполяризующие растворы с низкой концентрацией калия (12,5 и 25 мМ) не вызывали сократительных ответов в среде, содержащей ионы марганца. Однако добавление 50-и ммольной концентрации хлорида калия вызывало сокращения величиной 35 ± 7 мг, а 100- и 200-ммольные концентрации соответственно увеличивали амплитуды сокращений до 179 ± 16 мг и 232 ± 10 мг. При сравнении полученных результатов с фоновыми измерениями отмечается заметное смещение кривой «доза-ответ», полученной на фоне марганца, вправо. На фоне действия высоких концентраций калия различия в амплитудах сокращений уменьшались. Статистическая обработка показала, что на фоне действия 200-ммольной концентрации КСI амплитуда сокращений в присутствии марганца не имела достоверных различий с сокращениями в ответ на эту же концентрацию калия в обычном растворе. Особенностью сократительных реакций на различные концентрации хлорида калия в присутствии ионов марганца явилось отсутствие фазной компоненты.

2. Влияние бескальциевых растворов на калиевые контрактуры

В данной серии экспериментов регистрировались сокращения при действии ионов калия (12,5; 25; 50; 100; 200 мМ КСI) в нормальном солевом растворе (фоновые сокращения) с последующей заменой его на бескальциевый раствор, содержащий 1 мМ хелатона. Замещение нормального раствора бескальциевым вызывало процесс расслабления, достигавший величины 127 ± 11 мг ($n=12$). После двухчасовой инкубации полосок в бескальциевом растворе повторялась серия воздействия тех же концентраций хлористого калия. При добавлении 12,5; 25; 50 мМ КСI сократительные ответы не появлялись, однако 100- и 200-ммольные концентрации деполяризующего агента вызывали сокращения с амплитудой в 17 ± 4 и 80 ± 21 мг ($n=12$). Но при последующем выдерживании препаратов в бескальциевом

растворе сократительная активность даже при действии высоких доз ионов калия полностью исчезала. Восстановление нормальной концентрации кальция в окружающем растворе (2,5 мМ) приводило к восстановлению утраченного тонуса и фоновой активности.

3. Эффект бескальциевой среды с ионами марганца на калиевые контрактуры

Для предотвращения выхода ионов кальция по градиенту концентрации из гладкомышечных клеток в бескальциевый раствор полоски сосудов предварительно инкубировались в нормальном растворе, содержащем ионы марганца, и лишь затем помещались в бескальциевый раствор, содержащий ту же концентрацию $MnCl_2$. В отличие от опытов предыдущей серии расслабление гладких мышц при помещении препаратов в бескальциевый раствор не возникало. После двухчасовой инкубации в этих условиях проводилась стимуляция препаратов тремя концентрациями хлорида калия: 50, 100, 200 мМ. Оказалось, что в данных условиях эксперимента гладкие мышцы не теряли сократительной активности, и механические ответы достигали величин, регистрируемых в нормальном солевом растворе. Соответственно указанным дозам стимулятора получены ответы величиной 43 ± 5 мг, 166 ± 17 мг и 212 ± 17 мг. При статистической обработке экспериментального материала выявлено, что амплитуды полученных сокращений не обнаруживают достоверных различий как в условиях бескальциевой среды, так и в растворе, содержащем нормальную концентрацию ионов кальция и $MnCl_2$. В то же время в бескальциевой среде, не содержащей ионов марганца, калий вызывает достоверно меньшие по величине сокращения ($P < 0,05$ при действии 100 и 200 мМ), а при действии 50 мМ они отсутствуют. Следует отметить, что выдерживание препаратов в бескальциевом растворе, содержащем ионы марганца, в течение 10 и более часов практически не меняло характера калиевых контрактур и на протяжении указанного промежутка времени мы ни разу не наблюдали ослабления механической активности в данной среде.

4. Влияние ионов марганца на сокращения в ответ на быстрое растяжение и электрическую стимуляцию

Для выяснения значения внеклеточного кальция в механизме действия быстрого растяжения и электрической стимуляции нами были проведены опыты с блокадой кальциевой проницаемости мембраны гладкомышечных клеток мозговых артерий, создаваемой добавлением в раствор Кребса ионов марганца (10 мМ).

Напомним, что в нормальной солевой среде препараты сосудов мозга отвечали активной сократительной реакцией на применение механического стимула. Электрическая стимуляция была также эффективной во всех экспериментах и приводила к возникновению сокращений. Однако блокада кальциевой проницаемости мембран гладкомышечных клеток ионами марганца полностью подавляла сократительную активность при действии как механического, так и электростимулирующего воздействия.

К МЕХАНИЗМАМ АДРЕНЕРГИЧЕСКОГО И ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ МОЗГОВЫХ АРТЕРИЙ

В данном разделе работы ставились задачи: исследовать влияние катехоламинов и ацетилхолина на сократительную деятельность гладких мышц мозговых артерий в нормальном солевом растворе и в присутствии альфа- и бета-адреноблокаторов; изучить влияние медиаторов парасимпатической и симпатической систем на сократительную функцию клеток исследуемых гладких мышц в условиях выключения мембранного механизма активации ионами калия и, наконец, выяснить характер ответов на данные вещества в условиях блокады кальциевой проницаемости клеточных мембран ионами марганца.

1. Действие возрастающих концентраций адреналина, норадреналина, изопропилнорадреналина на сократительную активность в нормальном солевом растворе и на фоне альфа- и бета-адреноблокаторов

На препаратах срединной мозговой артерии накопительным методом зарегистрирована сократительная активность гладких мышц при действии возрастающих концентраций ($1 \cdot 10^{-9}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл) симпатических аминов: адреналина, норадреналина, изопропилнорадреналина. Все три стимулирующие агента вызывали однонаправленные эффекты, амплитуды которых зависели от концентрации действующего вещества. Обнаружено, что пороговые дозы для адреналина находятся в области применения $1 \cdot 10^{-9}$ г/мл, норадреналина — $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл, изопропилнорадреналина — $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл. Максимальные сократительные ответы наблюдались при действии концентраций: $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Статистическая обработка показала, что различия амплитуд контрактильных ответов при действии одних и тех же доз адреналина, норадреналина и изопропилнорадреналина достоверны ($P < 0,05$). Добавление в раствор феноксibenзамина ($1 \cdot 10^{-7}$ г/мл) меняло характер сокращений, вызываемых катехоламинами в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл. В основном, умень-

шались амплитуды сокращений, вызванных норадреналином ($P < 0,01$; $n = 5$), и почти не изменялась величина сокращений при действии изопропилнорадреналина ($P > 0,05$; $n = 5$).

Инкубация препаратов в растворе, содержащем $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл пропранолола, снижала сократительную активность в ответ на введение катехоламинов в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл. Пропранолол в большей степени подавлял действие изопропилнорадреналина ($P < 0,05$; $n = 8$) и в меньшей — норадреналина ($P > 0,05$; $n = 8$).

Одновременное введение альфа- и бета-адреноблокаторов значительно подавляло эффекты адреналина, норадреналина и изопропилнорадреналина.

2. Влияние на сократительную активность возрастающих концентраций ацетилхолина

Целью настоящей серии опытов было выяснение характера действия медиатора парасимпатической нервной системы на сократительную активность гладкомышечных элементов мозговых артерий, а также получение экспериментальной кривой «доза-ответ» для выбора оптимальной концентрации ацетилхолина, которой можно было бы воспользоваться в последующих сериях экспериментов. Опыты показали, что введение ацетилхолина в дозах: $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ г/мл приводило к возрастанию механического напряжения. Амплитуды сократительных ответов контрактурного типа колебались в диапазоне, не превышающем 123 мг. Максимальной величины ответы (109 ± 15 мг) наблюдались при действии ацетилхолина в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ г/мл, а при действии медиатора в дозе $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл регистрировались незначительные по величине эффекты (28 ± 4 мг). Поскольку способность к гладкомышечному сокращению после действия высоких доз ($1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ г/мл) медиатора при последующих воздействиях ослабевала, то в дальнейших исследованиях мы пользовались концентрациями ацетилхолина, не превышающими $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

3. Действие симпатического и парасимпатического медиаторов на фоне деполяризации клеточных мембран ионами калия

Для изучения механизма действия норадреналина и ацетилхолина на клетки гладкой мускулатуры исследуемых сосудов в данной серии экспериментов применялись эффективные концентрации указанных веществ на фоне различного уровня деполяризации мембраны ионами калия (25, 50, 100, 200 мМ). Ход эксперимента был следующим. В камеру, где находится препарат, вводился раствор ионов калия той или иной концентрации и регистрировалось сокращение. Затем на фоне развив-

шейся кальевой контрактуры в деполяризующий раствор добавлялся норадреналин ($1 \cdot 10^{-5}$ г/мл). Обнаружено, что на фоне контрактуры, вызываемой действием 25 мМ хлористого калия, норадреналин стимулировал прирост сократительной реакции, равный 71 ± 19 мг, что составляло примерно 50 % общей величины контрактуры. На фоне 50 мМ хлористого калия амплитуда прироста в ответ на введение норадреналина была значительно меньшей (28 ± 3 мг; $P < 0,01$; $n = 10$). На фоне действия 100 и 200-ммолярной концентрации хлористого калия добавление норадреналина не вызывало дополнительного прироста сокращения.

Аналогичное исследование было проведено и при действии ацетилхолина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. При регистрации сократительной активности обнаружено, что на частично деполяризованных препаратах (25 мМ КСl) ацетилхолин вызывал увеличение уровня гладкомышечного напряжения, однако амплитуда вызванных сокращений была достоверно уменьшенной по сравнению с фоновыми ($P < 0,01$; $n = 9$). В условиях деполяризации препаратов 50-ммолями хлорида калия мы ни разу не зарегистрировали повышение мышечного тонуса под влиянием ацетилхолина. Аналогичный результат был получен при действии ацетилхолина на фоне 100 мМ КСl.

4. Влияние ионов марганца на эффекты норадреналина и ацетилхолина

Для выяснения степени участия внеклеточного кальция при активации норадреналином и ацетилхолином проведена серия экспериментов с блокадой кальцевой проницаемости поверхностных мембран ионами марганца. В результате двадцатиминутной инкубации препаратов в солевой среде, содержащей 10 мМ $MnCl_2$, влияние норадреналина и ацетилхолина на механическую активность становилось полностью неэффективным.

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ СЕРТОНИНА И ГИСТАМИНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ГЛАДКИХ МЫШЦ МОЗГОВЫХ АРТЕРИЙ

В этом разделе работы ставились задачи: изучить характер прямого действия серотонина и гистамина на сократительную активность гладкомышечных клеток мозговых артерий и определить диапазон эффективных доз для этих веществ; исследовать действие серотонина и гистамина на механическую активность препаратов в условиях деполяризации клеточных мембран ионами калия; исследовать влияние ионов марганца на сократительную активность гладких мышц мозговых артерий при действии указанных активаторов.

1. Действие возрастающих концентраций серотонина

В настоящей серии экспериментов изучен характер действия серотонина на клетки гладкой мускулатуры срединной мозговой артерии при воздействиях серотонином в концентрациях от $1 \cdot 10^{-12}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Каждая серия воздействий проводилась накопительным способом — очередная доза препарата добавлялась на фоне максимального эффекта, развивавшегося от предшествующего введения. Таким образом, длительность стимуляции каждой концентрацией вещества определялась развитием эффектов до максимума.

Мы не обнаружили выраженных изменений уровня напряжения гладкомышечных препаратов при действии серотонина в концентрациях от $1 \cdot 10^{-12}$ до $1 \cdot 10^{-9}$ г/мл. Однако при дальнейшем увеличении концентраций серотонина в растворе, начиная с $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл, четко регистрировались сократительные ответы. Величина сокращений при действии пороговой концентрации в среднем равна 43 ± 8 мг. Механическое напряжение, развиваемое мышечными полосками, возрастало по мере увеличения концентрации действующего агента, и максимальной величины ответы (452 ± 77 мг) регистрировались при использовании серотонина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. При отмывании препаратов восстановление первоначального уровня напряжения проходило в течение 10—20 минут.

2. Действие возрастающих концентраций гистамина

В опытах использовались концентрации гистамина от $1 \cdot 10^{-12}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. При регистрации механической активности препаратов добавление в раствор Кребса $1 \cdot 10^{-12}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл гистамина не вызывало изменений величины гладкомышечного тонуса. Дальнейшее увеличение концентрации гистамина в омывающем растворе стимулировало мощное возрастание уровня механического напряжения препаратов. Максимально выраженные сократительные ответы наблюдались при действии гистамина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл (2112 ± 172 мг). Пороговая концентрация равнялась $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл и стимулировала ответы величиной 720 ± 48 мг. Действие гистамина на гладкие мышцы исследуемых артериальных сосудов характеризовалось стойкими контракуроподобными ответами, длительность которых практически зависела от продолжительности действия стимулирующего вещества. Повторная стимуляция гладкомышечных препаратов раствором гистамина оказывалась менее эффективной, что делало невозможным проведение повторных опытов на одном и том же препарате.

3. Действие серотонина на фоне деполяризации

В данной серии опытов для стимуляции гладкомышечных сокращений использовалась одна концентрация серотонина, равная $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл. Каждое воздействие проводилось на фоне предварительной деполяризации поверхностных мембран гладкомышечных клеток ионами калия (25, 100, 200 мМ). При регистрации механической активности обнаружено, что на частично деполяризованных препаратах (25 мМ КСl) серотонин вызывал сократительные эффекты величиной 311 ± 32 мг. На фоне 100-ммолярной концентрации ионов калия серотонин также вызывал контрактильный эффект, однако величина механических ответов в данном случае была меньше — 195 ± 35 мг. Обнаружено статистически значимое снижение амплитуды прироста напряжения препаратов, по сравнению с предварительно зарегистрированными фоновыми сокращениями ($P < 0,05$; $n = 9$). Развитие сократительных ответов при действии серотонина не исключалось даже в том случае, когда деполяризация мембран гладкомышечных клеток создавалась присутствием 200-ммолярной концентрации калия в окружающем растворе. При этом регистрировались сократительные ответы величиной 83 ± 23 мг, что статистически достоверно меньше, по сравнению с фоном ($P < 0,05$; $n = 9$).

4. Действие гистамина на фоне деполяризации

Вследствие быстрой потери чувствительности к гистамину при проведении повторных серий стимуляции этим веществом гладкомышечных клеток одного и того же препарата оказалось возможным использование лишь одной, заведомо большой концентрации ионов калия (200 мМ) для деполяризации и исключения предполагаемого мембранного механизма активации. На фоне 200-ммолярной концентрации ионов калия исследовалось методом накопительной кривой действие возрастающих концентраций гистамина ($1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл). После стабилизации уровня калиевой контрактуры в ванночку добавлялся гистамин. Использование гистамина в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл в этих случаях оказалось неэффективным, возрастание уровня механического напряжения было незначительным и обнаруживалось отчетливо лишь на двух из двенадцати исследованных препаратов. Однако более высокие дозы гистамина, начиная с $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл, в этих условиях стимулировали отчетливые сократительные реакции. Обнаружено статистически достоверное снижение амплитуды сократительных ответов при действии гистамина на фоне деполяризации ($P < 0,01$) по сравнению с сократительными ответами, обнаруженными при действии гистамина в нормальной солевой среде.

5. Действие серотонина на фоне блокады кальциевой проницаемости ионами марганца

На препаратах, предварительно протестированных ионами кальция, а затем инкубированных в растворе, содержащем 10 мМ $MnCl_2$, исследовалась сократительная активность при действии серотонина в концентрациях от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Двадцатиминутное выдерживание полосок в растворе, содержащем ионы марганца, полностью исключало возможность появления сократительных ответов при действии даже максимальных доз серотонина.

6. Действие гистамина в среде, содержащей ионы марганца

В данной серии экспериментов введению гистамина в раствор также предшествовала двадцатиминутная инкубация препаратов в растворе, содержащем 10 мМ $MnCl_2$. При действии гистамина на фоне ионов марганца наблюдалось появление ответных реакций. Амплитуды сокращений достигали в среднем 78 ± 25 мг в присутствии $1 \cdot 10^{-6}$ г/мл; 286 ± 56 мг при последующем десятикратном увеличении концентрации действующего агента ($1 \cdot 10^{-5}$ г/мл) и 589 ± 96 мг при действии гистамина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Статистическая обработка показала достоверное снижение величин регистрируемых сокращений по сравнению с фоновыми ($P < 0,001$; $n = 10$).

7. Действие гистамина в бескальциевой среде на фоне марганца

С целью выяснения влияния гистамина на процессы высвобождения внутриклеточных запасов кальция мы использовали описанный выше метод, позволяющий задержать выход кальция из клеток, помещенных в бескальциевый раствор (см. стр. 9). Двенадцать качественных воздействий гистамином в концентрации от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл показали, что в данных условиях эксперимента стимуляция сокращений используемым веществом оставалась эффективной.

ВЫВОДЫ

1. Гладкомышечные клетки артерий мозга крупного рогатого скота чувствительны к действию ионов калия. Величина калиевых контрактур градуально увеличивается соответственно концентрации ионов калия в омывающей среде и параллельно предполагаемым сдвигам мембранного потенциала. Продолжительность контрактур соответствует времени действия деполяризующего вещества.

2. Сократительные элементы исследованных артерий чувствительны к действию быстрого растяжения и трансмуральной электрической стимуляции.

3. Обнаружены активные сократительные реакции гладких мышц срединной артерии мозга при непосредственном действии катехоламинов. Адреналин активизирует сокращения в концентрациях от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл, норадреналин — от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл, изопропилнорадреналин — от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Феноксibenзамин в наибольшей степени подавляет действие норадреналина, а пропранолол — изопропилнорадреналина.

4. Ацетилхолин вызывает сократительные реакции, которые начинают регистрироваться при действии медиатора в дозе от $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл и достигают максимальной выраженности при концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ г/мл.

5. Действие норадреналина и ацетилхолина ослабевает на фоне увеличения концентрации калия в наружной среде и полностью исчезает на фоне 50—100 мМ КСl.

6. Гладкомышечные элементы мозговых сосудов чувствительны к действию гистамина и серотонина. Пороговые концентрации этих веществ составляют $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл, а максимальные ответы наблюдались при действии серотонина и гистамина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

7. Гистамин и серотонин эффективно действуют на фоне максимальной деполяризации клеточных мембран ионами калия. Однако амплитуды сократительных ответов уменьшаются пропорционально величине калийных контрактур.

8. Блокирование кальциевой проницаемости клеточных мембран снимает фазную компоненту калиевых контрактур, подавляет эффекты быстрого растяжения, электрической стимуляции, норадреналина и ацетилхолина, серотонина, но не подавляет ответные реакции при действии гистамина в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

9. Активация сократительных белков гладкомышечных клеток мозговых артерий быстрым растяжением, электрической стимуляцией, норадреналином, ацетилхолином осуществляется с обязательным участием возбудимой поверхностной мембраны. Ионы калия, серотонин и гистамин способны активировать сократительный аппарат на фоне выключенной электрогенной мембраны.

10. Электромеханическое сопряжение в гладкомышечных клетках артерий мозга осуществляется ионами кальция, поступающими в клетку как из внешней среды, так и высвобождающимися из внутриклеточных депо.

Работы по теме диссертации, опубликованные в печати

1. К изучению сократительных реакций клеток гладкой мускулатуры мозговых сосудов. «Физиологический журнал СССР», 58, 1, 1972. Совместно с Орловым Р. С. и Плехановым И. П.).
2. К механизму действия катехоламинов на сокращения гладкомышечных клеток мозговых сосудов. Материалы Всесоюзного симпозиума «Физиология гладкой мышцы», Ленинград, 1972. (Совместно с Орловым Р. С. и Плехановым И. П.).
3. К механизму активации сокращений гладкомышечных клеток мозговых сосудов. Материалы I-ой Всесоюзной конференции «Микроциркуляция», Москва, 1972. (Совместно с Орловым Р. С. и Плехановым И. П.).
4. Мембранные механизмы активации гладкомышечных клеток мозговых артериальных сосудов. Материалы Всесоюзной конференции в Палатке «Биофизика мембран», Каунас, 1973. (Совместно с Орловым Р. С.).
5. Электромеханическое сопряжение в гладких мышцах мозговых сосудов. Материалы международного симпозиума «Кровоснабжение головного мозга», Тбилиси, 1974. (Совместно с Орловым Р. С. и Плехановым И. П.).
6. К природе калиевой контрактуры в гладкомышечных объектах. «Физиологический журнал СССР», 60, 5, 1974. (Совместно с Васильевым А. Г. и Плехановым И. П.).
7. Исследование электромеханической связи в гладкомышечных клетках мозговых артериальных сосудов. «Физиологический журнал СССР», 60, 9, 1974. (Совместно с Орловым Р. С.).
8. Сократительная деятельность гладкомышечных клеток внутренней сонной и пиллярных артерий. Материалы Всероссийского симпозиума, Ленинград, 1974. «Диагностика и хирургическое лечение сосудистых заболеваний головного мозга». (Совместно с Игнатенко А. С. и Орловым Р. С.).
9. Некоторые особенности адренергических реакций клеток гладких мышц пиллярных сосудов. «Физиологический журнал СССР», 60, 12, 1974.