

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
СВЕРДЛОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВ
Анатолий Глебович

**Функциональная роль поверхностной
мембраны
гладкомышечных клеток миометрия**

(14.00.17 — нормальная физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Свердловск
1973

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
СВЕРДЛОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВ

Анатолий Глебович

Функциональная роль поверхностной
мембраны
гладкомышечных клеток миометрия

(14.00.17 — нормальная физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Свердловск
1973

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии Свердловского Государственного медицинского института.

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

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор *Шабунин Р. А.*
кандидат медицинских наук, доцент *Балезин Л. З.*

На внешний отзыв работа направлена в Казанский ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт им. Курашева.

Автореферат разослан «15» декабря 1973 г.

Защита диссертации состоится «15» января 1974 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.*

Изучение физиологических механизмов моторной функции миометрии является одной из актуальных задач теоретической и практической медицины. Важность вопроса находится в прямой связи с имеющими место в акушерской практике случаями возникновения слабости родовой деятельности. Частота этого вида осложнений течения родов достигает от 1,6 до 10,8% (Филимонов, Шерстнев — 1969). В тесной связи с патологией регуляторных механизмов сократительной деятельности миометрии находятся такие осложнения, как недонашивание и перенашивание беременности. С целью успешной борьбы с осложнениями, возникающими в процессе беременности и осуществления родового акта, является необходимым многостороннее изучение механизмов моторной деятельности матки, регуляции ее физиологических и биохимических процессов.

В последние десятилетия, связанные с внедрением в практику физиологического эксперимента методов отведения и регистрации электрической активности отдельных клеток и сократительной деятельности тонких пучков мышечных волокон, обязательным звеном в изучении общих нейро-гуморальных механизмов регуляции функции матки являются исследования на клеточном уровне.

С позиций вышеназванных методов перспективными являются исследования путей влияния окситоцина на деятельность матки. Специфическое стимулирующее влияние этого гормона на матку в значительной степени меняется в зависимости от гормонального фона и тех функциональных условий, которые возникают в процессе беременности и родового акта. Согласно данным ряда авторов (Жвания — 1970; Czekanowski, Urban—1970 и др.) с прогрессированием беременности чувствительность миометрии к окситоцину повышается, особенно непосредственно перед родами. Предполагается, что существенное значение для повышения чувствительности матки к окситоцину имеет влияние эстрогенов, хотя существующие данные по поводу действия эстрогенов на матку во время беременности довольно противоречивы. Работами многих авторов (Marshall, Csapo — 1961; Marshall — 1962, 1963 и др.) показано влияние окситоцина на электрическую ак-

тность миометрии. Однако, несмотря на большой материал, посвященный изучению действия этого гормона, механизм влияния окситоцина изучен недостаточно.

Другим важнейшим фактором, регулирующим функцию матки во время беременности и в родах, является растяжение миометрии растущим плодом. В настоящее время известно, что гладкомышечная клетка, являясь по роду своей деятельности эффектором, в то же время обладает и аффекторными свойствами. Эти свойства, несомненно, во многом определяют функционирование миометрии в процессе вынашивания беременности и осуществления родового акта. Достаточно большое количество литературы по этому важному вопросу не дает полного объяснения механизма действия растяжения.

Наконец, недостаточно изучен вопрос о регулирующем влиянии на миометрию ацетилхолина. Этот вопрос привлекает внимание физиологов в связи с тем, что ацетилхолину придается определенное значение в осуществлении родового акта.

В основе нашего изучения механизмов деятельности миометрии под влиянием экстрарегуляторных воздействий был положен принцип исследования процесса развития функциональных свойств матки в онтогенетическом аспекте.

В настоящей работе были поставлены следующие задачи: 1) выяснение сроков формирования электрогенных и механорецепторных свойств мембраны клеток гладкой мускулатуры матки; 2) проведение сравнительного анализа действия окситоцина и ацетилхолина на сократительную активность миометрии в онтогенезе; 3) сопоставление эффектов действия ацетилхолина и окситоцина на миометрий незрелых животных и миометрий зрелых животных с заблокированной кальциевой проницаемостью плазматической мембраны; 4) исследование принципа, лежащего в основе механизма действия окситоцина, в связи со значительной вариабельностью чувствительности ткани миометрии к действию этого гормона, имеющей место при различных гормональных состояниях, в процессе беременности и в родах.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регистрация электрической активности производилась с помощью микроэлектродной техники с использованием «плавающего» микроэлектрода. В наибольшей степени отвечали требованиям эксперимента микроэлектроды, изготовленные из стекла «пирекс» и имеющие сопротивление 10—50 мом. Изготовление

электродов производилось на вертикальном полуавтомате МЭ-3 с заданным режимом работы. Заполнение микроэлектродов производится их кипячением в растворе 2,5 М КСI (с использованием вакуумного насоса, позволяющего регулировать интенсивность кипячения). Готовые электроды хранились при температуре 2—5°C и использовались в течение следующего дня после их изготовления. Перед экспериментом микроэлектроды насаживались на платиновую проволочку диаметром 50 мк, которая соединялась с лампой первого каскада катодного повторителя. Введение микроэлектрода в клетку осуществлялось при помощи микроманипулятора. В качестве регистратора биоэлектрической активности исследуемого объекта и отметки времени был использован шлейфный осциллограф Н-102.

Регистрация сократительной активности миомерия производилась в условиях, наибольшим образом соответствующих изометрическому режиму опыта. В качестве датчика в работе использовался малогабаритный двоянный диодный механотрон типа 6МХ1С, обладающий свойством минимального смещения при действии на него значительных напряжений. Сигнал с механотрона поступает на усилитель постоянного тока, затем через делитель на многопредельный миллиампервольтметр постоянного тока типа Н39 для документальной записи и осциллограф С1-19Б для визуального контроля. Питание механотрона и усилителя осуществлялось стабилизированным источником. Препарат соединялся с датчиком через платиновую иглу.

Для исследования механизма действия быстрого растяжения на сократительную активность миомерия в работе было использовано растягивающее устройство, в основу которого был положен принцип работы электромагнита. Растягивающий момент имел место в результате притяжения якоря к катушке при подключении электрического тока к обмотке электромагнита.

Электростимуляция миомерия производилась раздражающими прямоугольными импульсами отрицательной полярности длительностью 10 мсек с лабораторного стимулятора ЭСЛ-1. Соотношение площадей раздражающих электродов (1:15) дало возможность получить истинное униполярное раздражение. В этом случае возбуждение всегда возникает на малом электроде вне зависимости от полярности раздражающего стимула (Crainfield et al. — 1957).

Для нагревания и поддержания постоянной температуры раствора Кребса и тестирующих растворов в эксперименте было использовано термостатирующее устройство, включающее ультратермостат У-10, специальную камеру с герметичной полостью

й систему подводящих трубок. Точность задания и поддержания необходимой температуры $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

В работе был использован раствор Кребса, имеющий следующий состав (в mM): NaCl — 118; KCl — 4,7; KH_2PO_4 — 1,2; MgSO_4 — 1,2; CaCl_2 — 2,5; NaHCO_3 — 14,9; глюкоза — 1,4 г/л; сахара — 17 г/л. Для получения гиперкальциевых растворов применялся раствор Кребса с последовательным добавлением в него KCl в концентрациях (в mM): 8; 12; 16; 23,5; 47; 70,5; 94 и 117,5. Гипернатриевый раствор создавался добавлением в нормальный раствор Кребса 42 mM NaCl, а гиперкальциевый раствор — добавлением в нормальный раствор Кребса 5 mM CaCl_2 . В экспериментах с использованием ионов марганца применялся раствор Кребса с добавлением 10 mM MnCl_2 и 20 mM MnCl_2 . Ацетилхолин добавляется в раствор Кребса в концентрации 10^{-5} г/мл, а окситоцин — в концентрациях (в МЕ/мл) $5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-2}$. Для работы использовались растворы, имеющие pH = 7,2 — 7,4. В ходе эксперимента растворы аэрировались смесью кислорода и углекислого газа, поддерживалась постоянная температура растворов $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Работа производилась на белых крысах. В эксперимент брались неполовозрелые животные первых недель постнатального онтогенеза, половозрелые небеременные животные и животные, находящиеся в предродовом периоде. Препараты представляли собой полоски миометрии 2×10 мм, вырезанные из областей рога матки, расположенных вдоль линии прикрепления брыжейки.

Регистрация электрической и механической активности препарата начиналась через 1 час с начала промывания его раствором.

Экспериментальный материал обработан статистически. Работа проведена на 142 крысах. Сделано 20 серий экспериментов. Проведено 87 измерений амплитуды потенциалов действия и 1868 измерений механического напряжения препаратов миометрии.

К МЕХАНИЗМУ МЕХАНОРЕЦЕПТИВНЫХ И ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК МИОМЕТРИИ

Изучение электрофизиологических и сократительных свойств клеток миометрии (Marshall — 1962; Као — 1967; Орлов, Кеткин — 1968; Орлов и др. — 1971) показало, что возбудимая клеточная мембрана является точкой приложения действия разно-

образных факторов. Эти факты позволяют предполагать существование общих механизмов, обеспечивающих контроль сократительного аппарата матки через изменения свойств возбудимой клеточной мембраны.

Поставив перед собой задачу изучения регуляторных механизмов миометрии под влиянием экзогенных факторов, мы положили в основу работы исследование процесса развития функциональных свойств матки в онтогенетическом аспекте. Данное решение было продиктовано тем, что увеличение роли экзогенной регуляции в функционировании системы возрастает постепенно, и это способствует дифференцировке структур и механизмов системы, используемых в ответной реакции на то или иное воздействие.

1. Формирование электрогенных и механорецепторных свойств клеток миометрия в онтогенезе.

Опыты проведены на миометрии животных одно-, двух- и трехнедельного возраста.

В период постнатального онтогенеза от рождения до двухнедельного возраста в гладкомышечных клетках матки не возникает ответной реакции ни на прямую электростимуляцию, ни на быстрое растяжение. В этот возрастной период не отмечалось также спонтанной сократительной активности препаратов. В экспериментах на миометрии крыс, начиная с двухнедельного возраста (13—14 дни постнатального онтогенеза) начинают появляться ответы как на быстрое растяжение, так и на прямую электростимуляцию. В этот период наиболее четко проявилась взаимосвязь между сократительными ответами на оба вида возмущений. Так, часть препаратов не проявляла еще ответной реакции на электрическую стимуляцию, и эти же самые препараты не реагировали на быстрое растяжение. Амплитуда сокращений (в пересчете на мг) препаратов миометрия незрелых животных была заметно меньшей, чем у взрослых. Так, амплитуда сократительных ответов на электрическую стимуляцию составляла в среднем $22,2 \pm 2,0$ мг, в то время как у зрелых крыс эта величина составила $259,4 \pm 14,6$ мг. В ответ на быстрое растяжение амплитуда сокращения полосок миометрия у двухнедельных животных составила в среднем $35,5 \pm 2,1$ мг, у взрослых животных эта величина соответствовала $274,2 \pm 17,4$ мг. По мере созревания животных амплитуда сокращений в ответ на механическую и электрическую стимуляцию постепенно растет. На 20—25 дни постна-

тального онтогенеза амплитуда сократительного ответа на электрическую стимуляцию составила $65,3 \pm 6,9$ мг, на быстрое растяжение — $92,1 \pm 7,9$ мг.

2. Влияние ионов марганца на сократительную деятельность клеток миометрия в ответ на электрическую стимуляцию и быстрое растяжение.

Для выяснения механизма действия быстрого растяжения проведены эксперименты с блокадой кальцевой проницаемости мембраны гладкомышечных клеток матки, создаваемой заменой раствора Кребса раствором, содержащим ионы марганца. В эксперименте использовались полоски миометрия половозрелых небеременных животных. В нормальной ионной среде все препараты обладали спонтанной электрической и сократительной активностью. Амплитуда потенциала действия составляла в среднем $26 \pm 2,8$ мв, амплитуда спонтанных сократительных ответов равнялась $247,7 \pm 14,8$ мг. Быстрое растяжение во всех случаях вызывало активный сократительный ответ, величина которого несколько превышала амплитуду спонтанных сокращений. Электрическая стимуляция также была эффективной во всех экспериментах и приводила к возникновению сокращений, по своей амплитуде близких к спонтанным.

Блокада кальцевой проницаемости поверхностной мембраны гладкомышечных клеток миометрия заметно изменяла характер спонтанной и вызванной активности препаратов. Полностью исчезали спонтанные сократительная и электрическая активности гладкомышечных клеток. Одновременно подавлялись ответы на быстрое растяжение и электрическую стимуляцию. Наблюдаемые сдвиги в электрической и сократительной деятельности гладкомышечных клеток миометрия были полностью обратимыми.

К МЕХАНИЗМУ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИОМЕТРИЯ

В данной главе ставились задачи выяснения сроков формирования сократительных ответов миометрия на воздействие ацетилхолина в процессе онтогенеза, проведения сравнительного анализа действия ацетилхолина, электрической стимуляции и быстрого растяжения на сократительную активность миометрия в онтогенезе, а также сопоставление эффектов действия ацетилхолина,

электрической стимуляции и быстрого растяжения на миометрия зрелых небеременных животных с заблокированной кальциевой проницаемостью плазматической мембраны.

В свете поставленных задач перед нами возникло еще несколько дополнительных вопросов. Дело в том, что для изучения физиологии миометрии удобным методическим приемом является использование прямого раздражения ткани различными химическими агентами. При таком методическом подходе в мышечных волокнах может развиваться сокращение типа контрактуры, имеющее существенные особенности в сравнении с обычной сократительной деятельностью. В связи с вышеизложенным в главе дополнительно решались вопросы о влиянии марганца на кальциевую проницаемость в условиях сократительной деятельности контрактурного типа и определения необходимой концентрации ионов марганца в растворе для достижения блокирующего кальциевую проницаемость эффекта.

1. Действие ионов марганца на сократительную активность миометрии в гиперкалиевых растворах.

В эксперименте использовались изолированные полоски миометрии половозрелых небеременных животных. В нормальной ионной среде препараты обладали спонтанной сократительной активностью. При помещении полосок миометрии в гиперкалиевые растворы с возрастающей концентрацией ионов калия препараты отвечали развитием длительной контрактуры. В течение сократительного ответа миометрии проявлялись две составляющие этого процесса. Первая компонента представляла собой начальную фазу сократительного ответа, амплитуда которого, практически, почти не зависела от изменения концентрации ионов калия в растворе. При добавлении в нормальный раствор Кребса хлористого калия в концентрации (в мМ): 8; 12; 16; 23,5; 47 и 70,5 амплитуда сокращений препаратов миометрии соответственно составила (в мг) $476,3 \pm 69,4$; $551,7 \pm 63,2$; $583,9 \pm 65,2$; $614,5 \pm 91$; $694,6 \pm 97,3$ и $705,9 \pm 94,6$. Различия в ряду величин амплитуды сокращений явились недостоверными.

В отличие от первой составляющей развитие второй, как правило, запаздывало во времени. Амплитуда сокращений этой фазы ответа проявила s-образную зависимость от концентрации ионов калия в растворе. Амплитуда сокращений в эту фазу в соответствии с применяемыми концентрациями хлористого калия, приведенными выше, составила (в мг) $49,6 \pm 15,2$; $99,6 \pm 13,1$; $203,5 \pm 28,9$; $473,1 \pm 41,7$; $618,9 \pm 92,7$ и $613,0 \pm 109,3$. При увеличе-

нии концентрации ионов калия в наружном растворе наблюдалось увеличение не только амплитуды сокращения во вторую фазу, но также скорости нарастания сократительного ответа.

При использовании раствора, содержащего ионы марганца, в значительной степени изменялась сократительная активность миомерия в ответ на повышение концентрации ионов калия. В этих условиях сократительные ответы начинают возникать лишь при добавлении в раствор Кребса 47 мМ KCl, в то время как в нормальном растворе (без наличия ионов марганца) сократительный ответ регистрируется уже при добавлении в раствор 8 мМ KCl. Сократительные ответы миомерия в растворе, содержащем ионы марганца, отличаются как по амплитуде, так и по динамике развития. В этом случае совершенно отсутствует быстрая фаза сокращения, медленная фаза значительно уменьшается по амплитуде. Величина сократительного ответа полосок миомерия в растворе «Кребс + 10 мМ $MnCl_2$ » при добавлении хлористого калия (в мМ) 47; 70,5; 94 и 117,5 имела соответственно величину (в мг) $36,2 \pm 9,4$; $47,3 \pm 13,3$; $72,9 \pm 13,7$ и $96,7 \pm 16,8$.

Исходя из задач работы, связанных с определением необходимой концентрации ионов марганца в растворе для достижения блокирующего кальциевую проницаемость эффекта, в экспериментах был использован раствор «Кребс + 20 мМ $MnCl_2$ ». В результате проведенных исследований было обнаружено, что сократительные ответы миомерия на воздействие возрастающих концентраций калия в этом растворе значимо не отличаются по амплитуде от сократительных ответов полосок миомерия, помещенных в раствор «Кребс + 10 мМ $MnCl_2$ ». Амплитуда сократительного ответа в растворе «Кребс + 20 мМ $MnCl_2$ » при добавлении хлористого калия (в мМ) 47; 70,5; 94 и 117,5 имела соответственно величину (в мг) $41,8 \pm 10,2$; $63,6 \pm 12,2$; $77,6 \pm 14,4$ и $91,4 \pm 13,0$.

2. Формирование сократительных ответов миомерия на воздействие ацетилхолина в процессе онтогенеза.

Эксперименты, проведенные на миомерии животных одно-, двух- и трехнедельного возраста, показали следующее. Сократительная ответная реакция полосок миомерия на воздействие ацетилхолина возникает, начиная с конца первой недели постнатального онтогенеза. В возрасте 7—11 дней амплитуда сократительного ответа равнялась в среднем $15,5 \pm 3,36$ мг. По мере созревания организма амплитуда сократительного ответа увеличивалась. Так, в возрасте 12—13 дней она составляла $81,8 \pm 8,5$ мг. В этот период еще не наблюдались ответные сократительные ре-

акции на воздействие быстрого растяжения и электрической стимуляции. В последующем амплитуда сократительного ответа на ацетилхолин все время увеличивается, достигая в возрасте 15—19 дней $96,9 \pm 10,3$ мг и в возрасте 20—25 дней амплитуда сокращений была равной $256,9 \pm 18,0$ мг.

3. Влияние ионов марганца на сократительные ответы клеток миометрии на воздействие ацетилхолина.

В эксперименте использовались изолированные полоски матки половозрелых небеременных животных. В нормальной ионной среде препараты обладали спонтанной сократительной активностью. Действие ацетилхолина во всех случаях вызывало активный сократительный ответ (типичную ацетилхолиновую контрактуру), амплитуда которого составляла в среднем $393,5 \pm 37,2$ мг и значительно превышала амплитуду спонтанных сокращений. Блокада кальциевой проницаемости мембраны гладкомышечных клеток миометрии заметно изменяла характер спонтанной и вызванной активности препаратов. Полностью исчезала спонтанная сократительная активность клеток. При воздействии ацетилхолина на фоне ионов марганца наблюдалось сохранение ответной реакции, хотя в этом случае величина амплитуды сокращения уменьшалась. Амплитуда сокращений снижалась по сравнению с фоновой ($p < 0,01$) и составляла $175,4 \pm 40,9$ мг, причем в этом случае сокращение имело вид контрактуры с отсутствием на ее фоне спонтанной сократительной активности, столь характерной для действия ацетилхолина в нормальном растворе. После замены раствора, содержащего ионы марганца, на нормальный раствор постепенно восстанавливалась спонтанная сократительная активность и типичная для нормального раствора ацетилхолиновая контрактура.

К МЕХАНИЗМУ РЕГУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ОКСИТОЦИНА НА МОТОРИКУ МИОМЕТРИЯ

1. Влияние различных концентраций окситоцина на сократительную деятельность миометрии.

Эксперименты выполнены на миометрии половозрелых небеременных крыс. В нормальной ионной среде все препараты обладали спонтанной сократительной активностью. Ответная реакция полосок миометрии на окситоцин выражалась в двух формах: в нарастании положительного хрооинотропного эффекта и в по-

следовательном увеличении амплитуды сокращения контрактурного типа. Применение концентраций окситоцина $5 \cdot 10^{-7}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ МЕ/мл не приводило к сколько-нибудь заметным изменениям в спонтанной сократительной активности изолированных полосок рогов матки. Концентрации окситоцина $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ МЕ/мл приводили к выраженному хронотропному эффекту, вызывая увеличение частоты спонтанной сократительной активности и амплитуды отдельных сокращений. При фоновом ритме спонтанной активности 0,5 сокр./мин. положительный хронотропный эффект выразился в 0,8 сокр./мин. от воздействия $5 \cdot 10^{-5}$ МЕ/мл окситоцина, в 1,0 сокр./мин. и 1,4 сокр./мин. при применении $5 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ МЕ/мл окситоцина соответственно. Инотропный эффект действия гормона выразился в увеличении амплитуды отдельных сокращений по отношению к фоновому значению ($622,4 \pm 88,8$ мг) до $760,3 \pm 93,4$ мг и $918,6 \pm 106,1$ мг при применении соответственно $5 \cdot 10^{-5}$ МЕ/мл и $5 \cdot 10^{-4}$ МЕ/мл окситоцина.

При использовании гормона в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ МЕ/мл наблюдаются начальные проявления контрактурных ответов, сопровождающие спонтанные фазные сокращения. С увеличением концентрации окситоцина ($5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ МЕ/мл) контрактурный компонент увеличивался. При применении концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ МЕ/мл сократительный ответ часто представлял типичную контрактуру с почти постоянным блокированием фазных сокращений. Такой ответ всегда имеет место при использовании окситоцина в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ МЕ/мл. Амплитуда контрактурных ответов составляла $119,1 \pm 18,6$ мг, $911,4 \pm 77,2$ мг и $1039,6 \pm 114,3$ мг при воздействии на исследуемую ткань соответственно (в МЕ/мл) $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ гормона.

2. Формирование сократительных ответов миометрия на воздействие окситоцина в процессе онтогенеза.

Эксперименты, проведенные на миометрии созревающих животных, показали следующее. Сократительная ответная реакция полосок миометрия на воздействие окситоцина в постнатальном онтогенезе возникает наиболее поздно по сравнению с формированием ответных реакций на электрическую стимуляцию и быстрое растяжение. У крыс почти до трехнедельного возраста окситоцин либо не вызывал никакого эффекта, либо вызывал снижение тонуса и расслабление полосок матки, что соответствует неспецифическому эффекту влияния окситоцина на различные ткани и органы. В большинстве экспериментов сокращения на окси-

тоцин появлялись в конце третьей недели после рождения. Чувствительность клеток миометрия к гормональному воздействию возрастет очень быстро и носит как-бы взрывной характер. Уже почти с момента появления первых ответов амплитуда «окситоциновых» сокращений значительно превышает амплитуду сокращений на электрическую стимуляцию и механическое раздражение. Так, в период 20—25 дней постнатального онтогенеза амплитуда сокращений в ответ на воздействие окситоцина составляла $165,3 \pm 17,7$ мг, в то время как амплитуда сокращений в этот период на электрическую стимуляцию и быстрое растяжение составила $65,3 \pm 6,9$ мг и $92,7 \pm 7,9$ мг соответственно.

3. Влияние ионов марганца на сократительные ответы клеток миометрия при воздействии окситоцина.

В эксперименте использовались изолированные полоски матки половозрелых небеременных животных. В нормальной ионной среде все препараты обладали спонтанной сократительной активностью. Действие окситоцина во всех случаях вызывало активную ответную реакцию (окситоциновую контрактуру), амплитуда которой составляла $424,5 \pm 23,2$ мг и значительно превышала амплитуду спонтанных сокращений. Блокада кальциевой проницаемости миоплазматической мембраны гладкомышечных клеток миометрия ионами марганца заметно изменяла характер спонтанной и вызванной активности препаратов. Полностью исчезала спонтанная сократительная активность клеток. После добавления ионов марганца в раствор, через несколько минут (обычно 6—10) амплитуда сокращений на окситоцин уменьшалась в несколько раз, и постепенно сократительные ответы исчезали полностью. После замены раствора, содержащего ионы марганца, на нормальный раствор Кребса восстанавливалась спонтанная сократительная активность и типичная для нормального раствора окситоциновая контрактура — эффекты были полностью обратимыми.

4. Влияние ионов марганца на сократительные ответы клеток миометрия беременных животных на воздействие окситоцина.

В опытах были использованы животные в последние дни беременности (20-ый—21-ый дни). В нормальной ионной среде препараты не обладали спонтанной сократительной активностью. Действие окситоцина во всех случаях вызывало активную сократительную реакцию. Ответ ткани миометрия на воздействие гор-

мона представлял собой периодическую сократительную деятельность, выраженную в виде следующих в правильном ритме ряда сокращений. Через некоторое время после отмывания окситоцина сократительная деятельность миометрия прекращалась.

Блокада кальцевой проницаемости мембраны гладкомышечных клеток миометрия значительно изменяла деятельность препаратов в ответ на применение окситоцина. После добавления ионов марганца окситоцин, вводимый в раствор через 15 минут после начала использования $MnCl_2$, не вызывал никакого эффекта. После замены раствора, содержащего ионы марганца, на нормальный раствор Кребса сократительная реакция полосок миометрия в ответ на применение окситоцина полностью восстанавливалась.

5. Влияние деполяризации поверхностной клеточной мембраны на действие окситоцина.

Эксперименты, проведенные на миометрии половозрелых небеременных крыс, показали следующее. В нормальной ионной среде все препараты обладали спонтанной сократительной активностью. При помещении полосок матки в растворы с возрастающей концентрацией ионов калия препараты отвечали развитием длительной контрактуры. Основные характеристики контрактурных ответов и их зависимость от концентрации экстраклеточного калия соответствовали рассмотренным и проанализированным ранее в разделе I главы «К механизму влияния ацетилхолина на сократительную деятельность миометрия».

В экспериментах использовались концентрации окситоцина, вызывающие максимальный эффект при фоновых воздействиях в нормальной ионной среде без повышенной концентрации ионов калия. Обычно это были концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ МЕ/мл окситоцина.

В результате проведенных опытов было обнаружено, что эффект действия окситоцина значительно уменьшался на фоне калиевых контрактур. Амплитуда сокращений на гормональное воздействие по отношению к фоновой ($1039,6 \pm 114,3$ мг) составила $940,7 \pm 57,2$ мг, $770,0 \pm 89,9$ мг, $299,4 \pm 57,4$ мг, $159,2 \pm 33,9$ мг, $105,0 \pm 19,4$ мг и $171,4 \pm 78,6$ мг в условиях применения соответственно (в мМ) 12; 16; 23,5; 47; 70,5 и 117,5 KCl.

Эффект действия окситоцина сохранялся в части экспериментов при использовании раствора «Кребс + 117,5 мМ KCl». Применением данного раствора предусматривалось получение эффекта превышения экстраклеточной концентрации калия над

внутриклеточной и, следовательно, достижение состояния полной деполяризации мембраны. Сократительный ответ в данных условиях эксперимента явился недостоверным.

Амплитуда сокращений полосок миометрии в результате суммарного воздействия ионов калия и окситоцина не превышала величины сократительного ответа, возникающего в результате применения только гормонального воздействия. Амплитуда сократительного ответа на действие окситоцина на фоне калиевой контрактуры зависит от величины ответа на гиперкалиевое воздействие. После замены тестирующих растворов на нормальный раствор Кребса восстанавливалась спонтанная сократительная активность — эффекты были полностью обратимыми.

6. Влияние гипернатриевых и гиперкальциевых растворов на действие окситоцина в условиях деполяризации поверхностной клеточной мембраны.

В результате проведенных опытов с гипернатриевыми растворами было обнаружено, что в этих условиях уменьшается амплитуда сократительных ответов как на воздействие ионов калия, так и на влияние окситоцина. Суммарная амплитуда сократительного ответа полосок миометрии на действие окситоцина и 23,5 мМ KCl в гипернатриевой среде составила $799,0 \pm 65,5$ мг по сравнению с амплитудой в $937,9 \pm 91,6$ мг в нормальном растворе Кребса. При использовании 47 мМ KCl эти цифры равнялись соответственно $748,3 \pm 47,8$ мг и $840,7 \pm 52,6$ мг. Полученные данные показывают также, что гипернатриевые растворы тормозят развитие калиевой контрактуры. Это четко прослеживается при использовании 23,5 мМ KCl. Амплитуда сократительного ответа на действие 23,5 мМ KCl в нормальном растворе Кребса и в растворе «Кребс + 42 мМ NaCl» составила $638,5 \pm 61,5$ мг и $117,0 \pm 27,2$ мг соответственно. В опытах с применением 117,5 мМ KCl не было найдено достоверных изменений в амплитуде сократительного ответа на окситоциновое воздействие.

В результате проведенных экспериментов с гиперкальциевыми растворами обнаружено, что в этих условиях происходит увеличение амплитуды сократительных ответов как на действие ионов калия, так и окситоцина по сравнению с фоновыми значениями. Суммарная амплитуда сократительного ответа полосок миометрии на действие окситоцина и 23,5 мМ KCl в гиперкальциевом растворе составила $1160,6 \pm 105,3$ мг по сравнению с амплитудой в $937,9 \pm 91,6$ мг в нормальном растворе Кребса. При использовании 47 мМ KCl эти цифры равнялись соответственно

1074,7 $\pm$ 97,1 мг и 840,7 $\pm$ 52,6 мг. Амплитуда ответа на гормональное воздействие по сравнению с фоном (299,4 $\pm$ 57,4 в растворе с 23,5 мМ КСl и 159,2 $\pm$ 33,9 мг в растворе с 47 мМ КСl) составила соответственно 478,6 $\pm$ 41,6 мг и 199,9 $\pm$ 16,1 мг. В опытах с использованием 117,5 мМ КСl не было найдено достоверных изменений в амплитуде сократительного ответа на окситоциновое воздействие.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные экспериментальные исследования показали важную функциональную роль поверхностной мембраны клеток миометрия в сократительных реакциях на экстрарегуляторные воздействия.

Структурные особенности миометриальной клетки в сравнении с волокнами скелетной мышцы и миокарда, заключающиеся в стностически слабом развитии саркоплазматического ретикулюма — структурно-функционального образования, являющегося резервуаром для внутриклеточного кальция, и в отсутствии специализированной системы проведения возбуждения от поверхностной мембраны к сократительным внутриклеточным белкам (типа Т-системы в скелетной мышце), заставляют предполагать, что поверхностная мембрана клеток миометрия играет основную роль не только в процессах генерации и проведения возбуждения, но является функциональным звеном, ответственным за электро-механическое сопряжение. В работе была подтверждена кальциевая природа потенциалов действия, что свидетельствует об использовании внеклеточного кальция и для возбудительного, и для контрактильного процессов. Данное обстоятельство предполагает наличие механизмов, регулирующих вход ионов кальция — активатора сократительного процесса — в клетку к сократительным белковым структурам. Наши данные позволяют думать, что такого рода регуляция осуществляется поверхностной клеточной мембраной. На уровне миоплазматической мембраны реализуются взаимоотношения многочисленных экстрарегуляторных воздействий. Так, торможение сократительной деятельности миометрия во время беременности и координированные, мощные сокращения во время родов опосредуются через уровень поляризации клеточной мембраны. В основе этого координирующего механизма лежит влияние половых гормонов — эстрогенов и прогестерона. Половые гормоны, изменяя величину мембранного потенциала от 20—45 мв (Goto, Csapo—1959; Marshall—1959; Кеткин — 1968) кастрированных животных до 38—55 мв у поло-

возрелых (эстрогендоминирующих) животных (Kao, Nishiya-
та — 1964; Кеткин — 1968) и до 52—75 мв у беременных (про-
гестерондоминирующих) животных (Marshall, Csapo — 1961;
Кеткин 1968), влияют тем самым на возбудимость миомерия.

В работе был вскрыт механизм, лежащий в основе действия
экстрарегуляторного фактора, играющего большую роль в функ-
ционировании матки — фактора растяжения. Исследованиями в
плане онтогенетического развития ткани миомерия был выяв-
лен феномен одновременного формирования свойств клеточной
мембраны, ответственных за электрическую возбудимость и ак-
тивный ответ на деформирующий клетку механический стимул.
Подтверждением мембранной природы эффекта действия меха-
нического растяжения явились эксперименты с блокадой каль-
циевой проницаемости клеточной мембраны, что вызвало подав-
ление сократительной деятельности мышцы матки. Данные ре-
зультаты исключили предположение о существовании механоре-
цепторных свойств во внутриклеточных структурах, так как
влияние деформирующего стимула в равной степени распростра-
няется на все клеточные компоненты.

С позиции действия механического фактора на сократитель-
ную активность матки через электрические параметры поверх-
ностной клеточной мембраны становится понятным сложный ме-
ханизм взаимодействия фактора растяжения и половых гормонов
в процессе вынашивания беременности и родов. Известно, что
различные гормональные состояния не изменяют принципиально
характер действия растяжения, но определяют степень деполяри-
зации клеточной мембраны. В клетках миомерия кастрирован-
ных животных с наличием очень узкой зоны между уровнем
мембранного потенциала покоя и уровнем критической деполяри-
зации уже легкое растяжение приведет к тому, что мембранный
потенциал многих клеток падает ниже уровня критической депо-
ляризации, что вызывает генерацию низкоамплитудных, нерегу-
лярных потенциалов действия, падение возбудимости миомерия
с дальнейшим блокированием проведения возбуждения и разви-
тия полноценных сокращений в матке. При эстрогендоминиру-
ющем фоне с наличием оптимального соотношения между уровнем
мембранного потенциала и уровнем критической деполяризации
лишь очень высокая степень растяжения способна вызвать паде-
ние мембранного потенциала ниже уровня критической деполя-
ризации с блокированием процесса возбуждения, проведения и
сократимости в миомерии. Отсюда понятно влияние прогестеро-
на, который, сохраняя высокий уровень мембранного потенциа-
ла, даже при большой степени растяжения, может поддерживать

возбудимость и сократимость миометрия, что необходимо для осуществления нормального родового акта.

Можно предполагать, что фактор хронического растяжения в процессе беременности в значительной степени влияет на деятельность матки. Он модулирует действие экзогенных факторов — медиаторов и гормонов, вызывая изменение электрических характеристик гладкомышечных клеток. Если значительное растяжение полосок матки кастрированных животных деполаризует клетки миометрия ниже порогового уровня и подавляет или значительно ослабляет чувствительность миометрия к экзогенным факторам, то после обработки эстрогенами или прогестероном оно деполаризует клетки в меньшей степени. Миометрий сохраняет способность отвечать на действие медиаторов, гормонов. Как нам кажется, основное функциональное значение механорецепторного механизма заключается в создании оптимальных условий для генерации потенциалов действия, так как умеренное растяжение, прикладываемое к гладкомышечным клеткам, вызывает деполаризацию их мембраны, генерацию потенциалов действия и сокращение. Единовременное появление электрогенных и механорецепторных свойств клеточной мембраны в процессе онтогенеза является, вероятно, отражением эволюционного приспособления мускулатуры матки к действию механической стимуляции — растяжению. Полученные в работе экспериментальные данные позволяют думать об общем мембранном механизме возбуждения гладкомышечных клеток миометрия электрическими и механическими стимулами.

Несколько своеобразным механизмом действия на функционирование ткани миометрия обладает медиатор парасимпатического отдела вегетативной нервной системы — ацетилхолин. Результаты работы по исследованию формирования функциональных свойств ткани миометрия в процессе онтогенеза, свидетельствующие о гетерохронности их созревания, показали, что ответы мышцы матки на действие ацетилхолина возникают в ткани с недостаточно сформированными свойствами возбудимой мембраны, то есть в те сроки онтогенеза, когда отсутствует электрическая возбудимость и ответ на механическое воздействие — быстрое растяжение. Способность ацетилхолина вызывать сокращения клеток миометрия с недостаточно сформированными свойствами возбудимой мембраны служит доказательством наличия дополнительной точки приложения действия этого медиатора помимо электрогенных структур поверхностной клеточной мембраны. Полученные данные подтверждаются экспериментами с блокадой кальциевой проницаемости мембран ионами марганца. Анализ

экспериментального материала, обнаруживший достоверное уменьшение амплитуды сокращения миометрия под влиянием ацетилхолина на фоне блокады электрогенных кальций-натриевых каналов клеточной мембраны с исчезновением быстрых сократительных ответов на фоне ацетилхолиновой контрактуры свидетельствует о наличии общего пути реализации эффекта действия электрической стимуляции и ацетилхолина, обеспечивающего инициацию сократительной деятельности миометрия. Сократительные ответы миометрия на действие ацетилхолина на фоне блокады электрогенных каналов поверхностной клеточной мембраны и выявление онтогенетического опережения формирования холинорецептивных свойств мышц матки по отношению к электрическим свойствам заставляют думать либо о повышении проницаемости мембраны для ионов кальция без использования ее электрогенных свойств (фармако-механический механизм), либо о действии ацетилхолина, направленного на высвобождение фракции кальция, находящейся в какой-либо биофазе мышечной клетки.

Исследования, проведенные в работе по изучению механизма действия гормона гипоталамо-гипофизарной системы — окситоцина, основной целью имели выявление уровня регуляции этого гормона в связи со значительной вариабельностью чувствительности ткани миометрия к действию окситоцина при различных гормональных состояниях, в процессе беременности и в родах.

Предположение о регуляторном влиянии окситоцина, реализующемся на уровне поверхностной плазматической мембраны гладкомышечных клеток миометрия с использованием электрогенных мембранных свойств, было сделано на основании изучения сократительных реакций миометрия на гормональное воздействие, формирующихся в процессе онтогенеза. Основавшие это предположение факты формирования сократительных свойств мышцы матки к окситоцину, возникающих лишь на фоне развития электрогенных мембранных свойств, были дополнены экспериментальными с блокадой проницаемости электрогенных мембранных каналов в условиях различного гормонального фона. Как в случае использования половозрелых небеременных животных (эстрогендоминирующий фон), так и в экспериментах с беременными крысами (прогестерондоминирующий фон) действие окситоцина при блокаде электрогенных мембранных каналов становится полностью неэффективным. Данные результаты были подтверждены в серии экспериментов с использованием гиперкалиевых растворов, вызывающих деполяризующий мембрану эффект. Была найдена прямая зависимость сократительных ответов миометрия на

действие окситоцина от величины амплитуды калиевой контрактуры, что предполагает наличие общей точки приложения действия этих двух факторов. Наши выводы о реализации влияния окситоцина через электрогенные структуры мембраны согласуются с данными исследователей, подчеркивающих, что изменение электрических и механических свойств миомерия под влиянием окситоцина зависит от исходного уровня мембранного потенциала.

Наша гипотеза мембранного действия окситоцина, имеющего в основе увеличение кальциевой и натриевой проницаемости, нашла свое подтверждение в экспериментах с использованием гипернатриевых и гиперкальциевых растворов. Уменьшение амплитуды сокращения миомерия в ответ на действие окситоцина в гипернатриевых растворах и увеличение амплитуды сокращения на действие гормона в гиперкальциевых средах являются характерными для конкурентных кальций-натриевых взаимоотношений, имеющих место на уровне поверхностной клеточной мембраны в процессе генерации возбуждения.

Таким образом, изучение электрофизиологических и сократительных свойств клеток миомерия показало, что возбудимая клеточная мембрана является точкой приложения действия разнообразных факторов: гормонов, медиаторов, механического растяжения, электрической стимуляции. Поверхностная клеточная мембрана наряду со свойствами, подчиняющимися общим закономерностям, характерным для возбудимых тканей, сочетает в себе некоторые специфические свойства, отличающие функционирование клеток миомерия от всех других клеток гладкой мускулатуры, скелетной мышцы и миокарда, выражающиеся в специфической реактивности клеток миомерия к половым гормонам и окситоцину.

ВЫВОДЫ

1. Динамика появления сократительных ответов миомерия в онтогенезе на электрическую стимуляцию и растяжение свидетельствует об одновременном формировании свойств клеточной мембраны, ответственных за электрическую возбудимость и активный ответ на деформирующий клетку механический стимул.

2. Блокада электрогенных кальций-натриевых каналов клеточной мембраны ионами марганца снимает активирующий эффект электрической стимуляции и быстрого растяжения на клетки миомерия взрослых небеременных крыс.

3. Ионы марганца оказывают блокирующий эффект на кальциевую проницаемость электрогенных каналов мембраны клеток

миометрия в условиях сократительной деятельности контрактурного типа.

4. Сократительные ответы миометрия на ацетилхолин в процессе постнатального онтогенеза возникают раньше, чем ответы на электрическую стимуляцию и быстрое растяжение.

5. Блокада кальцевой проницаемости мембраны клеток миометрия половозрелых небеременных животных уменьшает амплитуду сократительных ответов на воздействие ацетилхолина. По-видимому, ацетилхолин активирует сократительный аппарат клеток миометрия как за счет увеличения проницаемости мембраны к внешнему кальцию, так и за счет высвобождения фракции кальция, находящейся в какой-либо биофазе клетки.

6. Сократительная реакция миометрия на воздействие окситоцина формируется в процессе постнатального онтогенеза позже, чем ответы на электрическую стимуляцию и быстрое растяжение.

7. Блокирование ионами марганца кальцевой проницаемости клеточной мембраны миометрия половозрелых небеременных животных, а также беременных животных (находящихся в предродовом периоде) полностью подавляет сократительные ответы на окситоцин.

8. Деполаризация клеточной мембраны ионами калия уменьшает величину сократительных ответов миометрия на окситоцин пропорционально амплитуде калиевой контрактуры, что предполагает наличие общих путей действия этих двух факторов.

9. В гипернатриевых растворах амплитуда сокращений миометрия в ответ на действие окситоцина уменьшается. В гиперкальциевых растворах окситоцин увеличивает амплитуду сокращений. Эти результаты свидетельствуют о сохранении конкурентных кальций-натриевых взаимоотношений в механизме действия окситоцина.

10. В физиологических условиях активация окситоцином сокращений миометрия осуществляется с участием поверхностной возбудимой клеточной мембраны. По-видимому, основным в механизме действия окситоцина является увеличение проницаемости мембраны к ионам кальция и натрия внеклеточной среды. Нельзя исключить и возможности высвобождения кальция под влиянием окситоцина из поверхностной мембраны или внутриклеточных структур.

Работы по теме диссертации, опубликованные в печати

1. К механизму влияния ацетилхолина на сократительную деятельность миомерия. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума «Физиологическая роль медиаторов» Казань, 1972.

2. Онтогенез механорецептивных и электровозбудимых свойств мембраны клеток миомерия. Совместно с Орловым Р. С. Материалы Всесоюзного симпозиума «Физиология гладкой мышцы». Ленинград, 1972.

3. К механизму формирования функциональных свойств мембраны клеток миомерия. Совместно с Орловым Р. С. «Доклады Академии наук СССР», т. 206, № 6, 1972.

4. Роль клеточной мембраны в становлении гуморальной регуляции сократимости миомерия. Совместно с Орловым Р. С. «Физиологический журнал СССР», т. 58, № 11, 1972.
