

ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЯВЛЕНИЯ М-ХОЛИНОБЛОКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ОПЫТАХ С МИОМЕТРИЕМ КРЫСЫ

Сизова Е.Н., Циркин В.И.

Вятский социально-экономический институт, Кировская государственная медицинская академия

В опытах на 10 продольных полосках миометрия 5 крыс оценивали изменение их М-холинореактивности под влиянием непрерывного 100-минутного воздействия сыворотки (1:100) венозной крови небеременных женщин (n=7). Выявлено, что сыворотка (1:100) проявляла М-холиноблокирующую активность на протяжении всего времени ее воздействия, что объясняется наличием в ней эндогенного блокатора М-холинорецепторов. Уже спустя 10 минут после удаления сыворотки М-холинореактивность полосок миометрия восстанавливалась до исходного уровня, что говорит об обратимости эффекта этого фактора. Утверждается, что эндогенный блокатор М-холинорецепторов *in vivo* может существенно влиять на эффективность М-холинергических воздействий, регулирующих деятельность внутренних органов, в том числе сердца.

Еще в 1970 году в лаборатории Т.М. Турпаева было установлено [1], что 5-30-кратные разведения дефибринированной крови лягушки, крысы и кролика содержат устойчивый к кипячению фактор, вызывающий быстрое снижение М-холинореактивности изолированного сердца лягушки. По мнению [4,5,7], он является лизофосфатидилхолином. В нашей лаборатории [2,6,8,9,12] также обнаружен фактор, снижающий М-холинореактивность гладких мышц матки крысы и трахеи коровы; он был выявлен в сыворотке крови, ликворе, моче и околоплодных водах человека и назван эндогенным блокатором М-холинорецепторов. При этом мы не исключали, что он идентичен фактору, выявленному в лаборатории Т.М. Турпаева [1,4,5,7], а лизофосфатидилхолин является основным его компонентом. Обнаружение эндогенного блокатора М-холинорецепторов в организме человека и животных, несомненно, расширяет представление о механизмах холинергической регуляции деятельности внутренних органов (в том числе сердца) и указывает на необходимость более глубокого исследования вопроса о его природе, механизмах действия и физиологической роли. В этом аспекте, учитывая известный феномен «ускользания» при действии вагуса [3], актуальным представляется вопрос о длительности проявления эффекта эндогенного блокатора М-холинорецепторов в условиях его непрерывного воздействия на клетки-мишени. Изучение данного вопроса и явилось целью работы. Для этого исследовали длительность проявления М-холиноблокирующей активности сыворотки кро-

ви (1:100) небеременных женщин при ее непрерывном 100-минутном воздействии на изолированный миометрий крысы.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на 10 продольных полосках (длиной 6-8 мм и шириной 2-3 мм) рога матки небеременных крыс (n=5), взятых в опыт в фазе метаэструса или диэструса, которую определяли по картине влажалищного мазка. Регистрацию сократительной активности полосок и оценку изменения их М-холинореактивности под влиянием 100-кратного разведения сыворотки венозной крови 7 небеременных женщин осуществляли по методике [8,11] при температуре 38°C и пассивной аэрации рабочих камер (объемом 1мл) 6-канального «Миоцитографа», состоящего из самопишущего прибора Н-3020, механотрона 6МХ1С, термостатирующего устройства и шприцевого дозатора. Скорость перфузии полосок раствором Кребса, содержащего (в мМ) NaCl-136, KCl-4,7, CaCl₂-2,52, MgCl₂-1,2, KH₂PO₄-0,6, NaHCO₃-4,7, C₆H₁₂O₆-11,0 (pH=7,4), составляла 0,7 мл/мин, а их исходная нагрузка - 4,9 мН. Венозную кровь в количестве 7-8 мл получали от здоровых небеременных женщин (24-36 лет) в фолликулярную фазу менструального цикла (от всех доноров было получено согласие на взятие крови). Сыворотку получили путем 15-минутного центрифугирования крови при 2000 об/мин. Ее разводили в 100 раз раствором Кребса. Процедура эксперимента состояла в том (рис. 1), что каждую полоску матки подвергали периодическому (7 раз по 10 минут, с интервалом в 10 минут) тестированию ацетилхолином хлори-

дом (Россия), используемого в концентрации 10^{-6} г/мл. 1-е тестирование проводили до воздействия сыворотки крови, 2-е, 3-е, 4-е, 5-е и 6-е тестирования - на фоне ее непрерывного 100-минутного воздействия, а 7-е - спустя 10 минут после его завершения. По механограммам оценивали число

спонтанных сокращений за 10 минут, их амплитуду (мН) и суммарную сократительную активность (мН/10мин). Результаты исследования подвергнуты статистической обработке, а различия, оцениваемые по критерию Стьюдента, считали достоверными при $p < 0,05$.

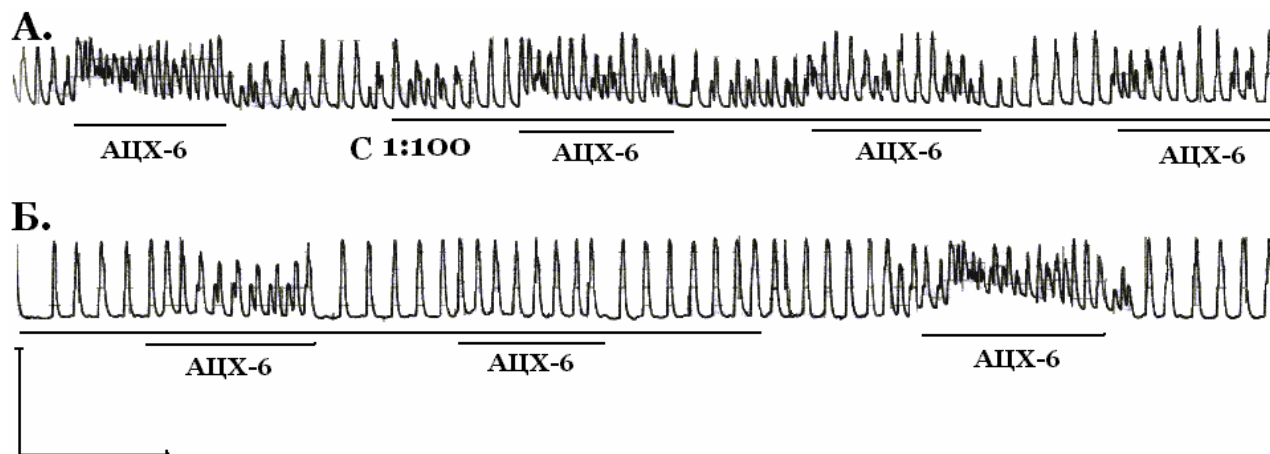


Рисунок 1. Механограмма продольной полоски рога матки небеременной крысы, демонстрирующая длительное сохранение М-холиноблокирующего влияния сыворотки крови (панель А – начало, панель Б – окончание). Горизонтальные линии под механограммой показывают момент воздействия 100-кратного разведения сыворотки крови (С 1:100) и ацетилхолина (10^{-6} г/мл; АЦХ-6). Калибровка 10 мН, 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные полоски обладали спонтанной сократительной активностью (табл., рис.1): на 10-минутном интервале они генерировали $7,6 \pm 1,0$ сокращений, амплитуда которых составила $5,9 \pm 0,9$ мН, а суммарная активность – $42,1 \pm 7,4$ мН/10мин. Ацетилхолин (10^{-6} г/мл) при 1-м тестировании обратимо усиливал сократительную активность полосок, в том числе он повышал частоту сокращений (до $15,0 \pm 2,14$ сокр/10мин.*, или до $200 \pm 19,9\%$ * от исходного уровня; символ * здесь и далее означает достоверность изменения исходных показателей, $p < 0,05$), их амплитуду (до $6,37 \pm 0,88$ мН или до $119 \pm 6,77\%$ *) и суммарную активность (до $95,6 \pm 15,6$ мН/10мин* или до $176 \pm 38,4\%$), а также базальный тонус. Эти результаты подтверждают данные о способности ацетилхолина оказывать утеростимулирующий эффект, который объясняется активацией М-холинорецепторов [2,8, 9,13].

Сыворотка венозной крови небеременных женщин в разведении 1:100 не вызвала достоверного изменения спонтанной сократительной

активности полосок (табл., рис.1 и 2), что не противоречит данным, полученным ранее в нашей лаборатории [2,8,9,10,11,13]. В частности, при действии сыворотки частота сокращений составила $8,0 \pm 0,44$ сокр/10мин или $130 \pm 23,8\%$ от фонового уровня, их амплитуда – $6,37 \pm 1,22$ мН или $104 \pm 5,71\%$, а суммарная активность – $50,9 \pm 11,7$ мН/10мин или $133 \pm 33,6\%$.

Установлено (табл., рис.1, рис.2), что сыворотка крови (1:100) проявляла М-холиноблокирующую активность, т.е. снижала стимулирующий эффект ацетилхолина при 2-м тестировании: при этом частота сокращений составляла $10,6 \pm 0,92$ сокр/10мин* или $159 \pm 19,9\%$ * от фонового уровня, их амплитуда – $6,37 \pm 1,12$ мН или $109 \pm 12,9\%$, а суммарная активность – $67,6 \pm 11,7$ мН/10мин. Следовательно, судя по абсолютным показателям, стимулирующий эффект ацетилхолина при 2-м тестировании был ниже, чем при 1-м. В отдельных опытах сыворотка крови почти полностью блокировала стимулирующий эффект ацетилхолина (рис. 1). В целом, эти результаты исследования подтверждают представление о наличии в крови эндогенного блокатора М-холинорецепторов [2,8,9,13].

Таблица 1. Частота, амплитуда и суммарная сократительная активность (Σ СА) продольных полосок рога матки небеременных крыс, при длительном (100 минут) воздействии 100-кратного разведения сыворотки (Сыв.) крови беременных (III триместр) женщин ($n=10$) и ацетилхолина (Ах, 10^{-6} г/мл).

Параметры спонтанной сократительной активности		Этапы эксперимента														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		Раствор Клейбса	Ацетил-холин	Раствор Клейбса	Сыво-полка	Сыв+Ах	Сыво-полка	Сыв+Ах	Сыво-полка	Сыв+Ах	Сыво-полка	Сыв+Ах	Сыво-полка	Сыв+Ах	Раствор Клейбса	Ацетил-холин
		-	1-e	-	-	2-e	-	3-e	-	4-e	-	5-e	-	6-e	-	7-e
Частота, сокр/10мин	M	7,60	15,0*	7,00	8,00	10,6*	7,40a	8,60ab	7,02a	7,41ab	7,43a	7,44ab	6,78a	7,59ab	8,05a	11,6*
	m	1,03	2,14	0,77	0,44	0,92	0,51	0,81	0,44	0,92	0,51	0,67	0,49	0,98	0,44	0,24
Частота, %	M	100	200*	92,1	130	159*	112	133	107	115	118	115	107	117	105	146*a
	m	0	19,9	6,87	23,8	19,9	16,7	25,1	17,5	24,1	27,4	22,7	23,8	24,2	11,9	7,57
Амплитуда, мН	M	5,88	6,37	5,88	6,37	6,37	5,88	6,86	6,37	6,57	7,06	6,86	7,35	6,86	7,35	9,31*
	m	0,93	0,88	1,02	1,22	1,12	1,12	1,02	1,07	1,22	1,32	1,17	0,98	1,22	1,22	1,22
Амплитуда, %	M	100	119*	100	104	109	103	121	109	110	119	120	126*	119	108	145
	m	0	6,77	6,41	5,71	12,9	8,19	16,1	5,38	13,8	14,6	11,3	11,4	11,5	8,07	34,5
Σ СА, мН/10мин	M	42,1	95,6*	39,2	50,9	67,6b	45,6	61,3b	41,2	50,9ab	54,9	52,4ab	51,0	54,4ab	48,3	111*
	m	7,35	15,6	5,88	11,7	11,7	8,33	10,7	10,7	10,8	13,2	9,80	8,82	11,7	9,31	15,6
Σ СА, %	M	100	176	92,8	133	177*	116	165	116	132	144	138	131	145	114	204*
	m	0	38,4	15,3	33,6	33,3	22,0	39,1	17,0	31,8	39,6	30,2	23,7	36,7	8,12	41,8

Примечание 1: * - различия с исходным уровнем (с 1 этапом эксперимента) достоверны, ($p<0,05$); a, b - означают достоверность различий ($p<0,05$) между значениями 2 и 5, 7, 9, 11, 13, 15; (*), (b), 15 и 2, 5, 7, 9, 11, 13 (b) этапами эксперимента.

Примечание 2: относительные значения 2-15 этапов эксперимента выражены в % к значениям 1 этапа.

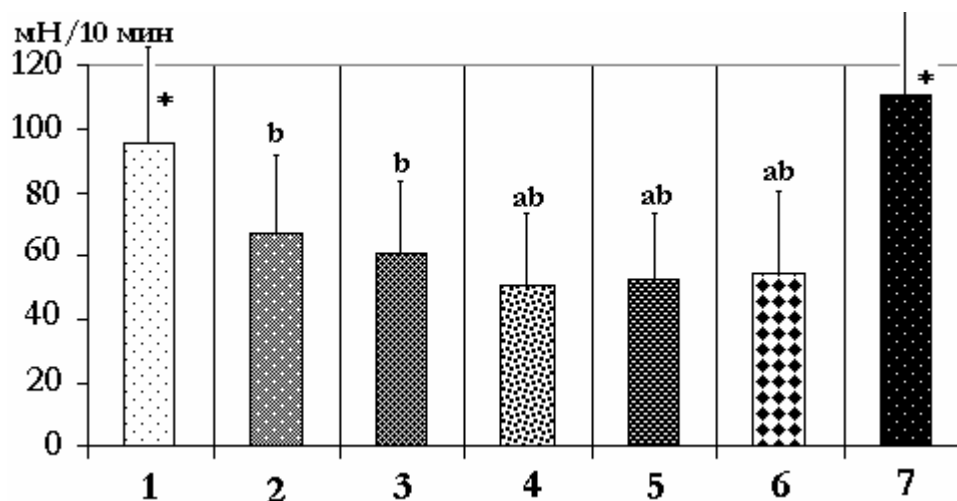


Рисунок 2. Суммарная сократительная активность (мН/10мин) продольных полосок рога матки небеременных крыс при 10-минутных их тестированиях ацетилхолином (10^{-6} г/мл) до (1), во время (2 – 6, с 10-минутными интервалами) и после (7) непрерывного (100-минутного) воздействия 100-кратного разведения сыворотки крови небеременных женщин. Символы означают, что различия с исходным уровнем (*), а также с 1-м (^a) и 7-м (^b) тестированиями ацетилхолином достоверны, $p < 0,05$.

При 7-м (заключительном) тестировании полосок, которое проводилось спустя 10 минут после удаления сыворотки крови, ацетилхолин оказывал выраженный стимулирующий эффект, т.е. повышал частоту сокращений (до $11,6 \pm 0,24$ сокращений за 10мин* или до $146 \pm 7,57\%*$ от фонового уровня), их амплитуду (до $9,31 \pm 1,22$ мН* или до $145 \pm 34,5\%$), суммарную активность (до $111 \pm 15,6$ мН/10 мин* или до $204 \pm 41,8\%*$), а также базальный тонус. По своим характеристикам этот эффект был близок к эффекту, который оказывал ацетилхолин при 1-м тестировании полосок. Все это указывает на то, что даже после 100-минутной непрерывной перфузии сывороткой крови полоски миометрия способны быстро восстанавливать исходную М-холинореактивность.

Представленные данные позволяют утверждать, что в условиях целостного организма эндогенный блокатор М-холинорецепторов может существенно влиять на эффективность М-холинергических воздействий, регулирующих деятельность внутренних органов, в том числе сердца. Доказательством этому служат и данные нашей лаборатории [14] о взаимосвязи между содержанием в крови беременных женщин эндогенного блокатора М-холинорецепторов, определяемом в опытах с изолированным сердцем лягушки, и вариабельностью их сердечного ритма. С этих позиций не исключается, что эффективная регуляция сердечной деятельности возможна лишь при низком уровне эндогенного блокатора М-холинорецепторов. Наиболее вероятно, что такой уровень возникает у человека при относительно высокой двигательной активности и оптимальном поступлении в организм жиров, так

как по своей природе, учитывая данные [4,5,7], эндогенный блокатор М-холинорецепторов, скорее всего, является лизофосфатидилхолином, который, как известно, образуется в результате окисления липидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звездина Н.Д., Турпаев Т.М. Холинолитические свойства сыворотки крови. Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 56 (8): 1136-1141. 1970.
2. Мальчикова С.В., Сизова Е.Н., Циркин В.И., Гуляева С.Ф., Трухин А.Н. М-холиноблокирующая активность сыворотки крови при остром коронарном инциденте и влияние на нее физических тренировок. Рос. физиол. журн. 89 (5): 556-563. 2003.
3. Ноздрачев А.Д., Баженов Ю.И., Баранникова И.А., Батуев А.С., Бреслав И.С., Кассиль В.Г., Коваленко Р.И., Константинов А.И., Лапицкий В.П., Лупандин Ю.В., Марьянович А.Т., Матюшкин Д.П., Наточин Ю.В., Овсянников В.И., Поляков Е.Л., Пушкарев Ю.П., Хавинсон В.Х., Чернышева М.П. Начала физиологии: Учебник для вузов. 2-е изд. /Под. ред. акад. А.Д. Ноздрачева.- СПб.: Изд-во «Лань». 751-762. 2002.
4. Проказова Н.В., Звездина Н.Д., Коротаева А.А. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки. Обзор. Биохимия. 63 (1): 38-46. 1998.
5. Проказова Н.В., Звездина Н.Д., Сулова И.В., Коротаева А.А., Турпаев Т.М. Влияние лизофосфатидилхолина на чувствительность сердца к ацетилхолину и параметры связывания хи-

нуклидинилбензилата с мембранами миокарда. Рос. физиол. журн. 84 (10): 969-978. 1998.

6. Сизова Е.Н., Циркин В.И., Дворянский С.А. Изучение роли эндогенных модуляторов хемореактивности в регуляции коронарного кровотока. Рос. физиол. журн. 88 (7): 856-864. 2002.

7. Суслова И.В., Коротаяева А.А., Проказова Н.В. Изменение параметров равновесного связывания [³H]-хинуклидинилбензилата на мембранах предсердия кролика под действием лизофосфатидилхолина. Доклады РАН. 342 (2): 273-276. 1995.

8. Циркин В.И., Дворянский С.А., Осокина А.А. Пономарева И.А., Снигирева Н.Л. Способность сыворотки крови человека ингибировать сократительную реакцию миомерия на ацетилхолин. Лекарственное обозрение. (4): 49-54. 1996.

9. Циркин В.И., Дворянский С.А. Сократительная деятельность матки (механизмы регуляции). Киров. 1997.

10. Циркин В.И., Дворянский С.А., Джергения С.Л., Неганова М.А., Братухина С.В., Сизова Е.Н., Шушканова Е.Г., Видякина Г.Я., Туманова Т.В. β-Адреномиметический эффект сыворотки

крови человека и животных Физиология человека. 23 (3): 88-96.1997.

11. Циркин В.И., Дворянский С.А., Ноздрачев А.Д. Братухина С.В., Морозова М.А., Сизова Е.Н., Осокина А.А., Туманова Т.В., Шушканова Е.Г. Адреномодулирующие эффекты крови, ликвора, мочи, слюны и околоплодных вод человека. Доклады РАН. 352 (1): 124-126: 1997.

12. Циркин В.И., Ноздрачев А.Д., Сизова Е.Н., Дворянский С.А., Сазанова М.Л. Система эндогенной модуляции, регулирующая деятельность периферических автономных нервных структур. Доклады РАН. 383 (5): 698-701. 2002.

13. Циркин В.И., Ноздрачев А.Д., Сизова Е.Н., Мальчикова С.В., Гуляева С.Ф. Изменение содержания в крови эндогенных модуляторов β-адрено- и М-холинореактивности под влиянием физических тренировок у лиц, перенесших инфаркт миокарда. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 136 (7): 18-22. 2003.

14. Циркин В.И., Трухин А.Н., Сизова Е.Н., Кононова Т.Н., Кайсина И.Г., Макарова И.А., Печенкина Н.С., Дворянский С.А. Влияние эндогенных модуляторов β-адрено- и М-холинореактивности на вариабельность сердечного ритма. Вятский медицинский вестник. (2): 39-41. 2003.

Duration of display of M-cholinoblocatory activity of human blood serum in experiment with rat myometrium

Sizova Ye.N., Tsirkin V.I.

In experiments on 10 longitudinal myometrium strips of 5 rats estimated their change M-cholinoreactivity under influence of continuous 100-minute influence of venous blood serum (1:100) of non-pregnant women (n=7). It is revealed, that serum (1:100) showed M-cholinoblocking activity during all time of its influence that was explained presence in serum endogenous M-cholinoreceptor blocking agent. Already later 10 minutes after removal of serum M-cholinoreactivity of myometrium strips it was restored up to an initial level that direct on convertibility of effect of this factor. It was concluded, that endogenous M-cholinoreceptor blocking agent in vivo can influence essentially on efficiency of M-cholinergic effects, witch regulate activity of visceral organs, including heart.