

УДК 612.821

И. Р. Евдокимов, И. В. Фролькис

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕНИЯ ОСМОЛЯРНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ НА РЕАКЦИИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ, ВЫЗВАННЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОМ

Среди различных факторов, оказывающих влияние на местную регуляцию сосудистого тонуса, существенную роль играет увеличение осмолярности внеклеточной среды [3, 6, 11, 12, 13], которое приводит к существенным изменениям электрической и сократительной активности сосудистой гладкой мышцы [1, 2, 9, 10]. В гиперосмолярных растворах угнетается спонтанная электрическая и сократительная активность гладкой мышцы воротной вены крыс. При повышении осмолярности нарушаются межклеточные связи в нексусах и межклеточное проведение возбуждения. Повышение осмолярности внеклеточной среды существенно изменяет реакции гладкой мышцы воротной вены крысы на норадреналин и ацетилхолин [9].

При внутриклеточных, микроэлектродных исследованиях, проведенных на различных сосудах, в том числе и на воротной вене [7], было показано, что ацетилхолин оказывает на электрическую активность гладкомышечных клеток двухфазное действие — вначале вызывает гиперполяризацию мембраны гладкомышечных клеток (первые 20—120 с), за которой следует фаза деполяризации мембраны. Степень гиперполяризации зависит от исходного уровня мембранного потенциала клеток. Подробные данные о влиянии ацетилхолина на электрические характеристики гладкомышечных клеток воротной вены овцы получены Накаямо с соавт. [14]. Показано, также, что на гладкие мышцы артериол ацетилхолин оказывает дилататорное действие [8, 15]. Считают, что увеличение напряжения гладких мышц крупных сосудов под действием ацетилхолина связано с его влиянием на выход катехоламинов из сосудистой стенки. Прямое же дилататорное действие ацетилхолина связывают с гиперполяризующим его влиянием мембраны гладкомышечных клеток мелких артерий и артериол.

Существенную роль в регуляции регионарного сосудистого тонуса играют изменения осмолярности внеклеточной среды и влияние медиаторов. При совместном их воздействии реакции гладких мышц сосудов могут отличаться от наблюдаемых при действии каждого из этих факторов в отдельности. Поэтому представляет интерес исследование реакций сосудистых гладких мышц на действие ацетилхолина в условиях повышения осмолярности внеклеточной среды.

Методика исследований

Эксперименты проведены на изолированных отрезках (длиной 6—8 мм) воротной вены крысы. Препарат помещали в камеру, через которую протекали изоосмолярные или гиперосмолярные растворы Кребса с добавлением ацетилхолина в различной концентрации и без него. Повышение осмолярности растворов достигали добавлением сахаразы в концентрации 43,8, 73, 146 и 292 ммоль/л, что соответствовало увеличению осмолярности на 15, 25, 50 и 100% соответственно. Растворы имели температуру 36—37°С

и насыщались 95% O_2 + 5% CO_2 . Сократительную активность измеряли с помощью механопреобразователя 6МХ1С. Электрические измерения проводили внутриклеточно, стеклянными микроэлектродами. Электрическую и сократительную активность регистрировали на ленте двухканального электронного самопишущего потенциометра и экрана двухлучевого осциллографа С1-18 с помощью фоторегистратора ФОР-2.

Гладкомышечные клетки воротной вены крысы изучали также с помощью электронного микроскопа типа В-513А фирмы TESLA. Для выявления влияния повышенной осмолярности внеклеточной среды на структуру гладкой мышцы препараты воротной вены после отмывания от крови в изотоническом растворе Кребса помещали на 5 мин в раствор Кребса удвоенной осмолярности (за счет сахарозы). Контрольные препараты в это время находились в изотоническом растворе Кребса. Дальнейшая фиксация (1% раствор осмиевой кислоты), заливка (аралдит или эпон), изготовление срезов и контрастирование (уранилацетат или гидроокись свинца) производили по общепринятым методикам, как и в предыдущих работах [2].

Результаты исследований

Проведенные эксперименты показали, что добавление ацетилхолина в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл к изотоническому раствору Кребса вызывает в гладкомышечных клетках воротной вены крысы деполяризацию на 8—10 мВ от исходного уровня. На фоне деполяризации частота пиковых разрядов растет. Под действием ацетилхолина в этой концентрации происходит увеличение силы фазных сокращений и тонического напряжения гладкой мышцы воротной вены (рис. 1, А). В ряде опытов деполяризации предшествовала кратковременная гиперполяризация на 10—12 мВ.

При повышении осмолярности внеклеточной среды вдвое гладкомышечные клетки воротной вены крысы изменяют свои электрические параметры. Одни клетки сразу же после начала воздействия прекращают

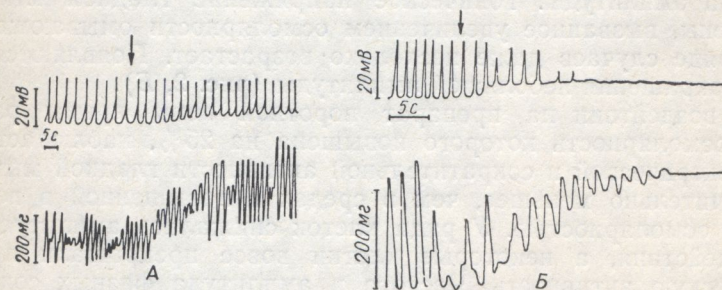


Рис. 1. Влияние ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл (А) и раствора Кребса удвоенной осмолярности (Б) на спонтанную электрическую (верхние кривые) и сократительную (нижние кривые) активность гладкой мышцы воротной вены крысы.

Линия со стрелкой — начало воздействия.

свою спонтанную активность, другие — через некоторое время, но не позднее, чем через 100—150 с. Спонтанная сократительная активность воротной вены крысы при повышении осмолярности также значительно изменяется. Амплитуда фазных сокращений в перфузионном растворе удвоенной осмолярности резко уменьшается и через некоторое время почти полностью исчезает. При этом развивается значительное тоническое напряжение (рис. 1, Б).

Реакции гладкой мышцы воротной вены крысы на ацетилхолин на фоне вдвое повышенной осмолярности внеклеточной среды имеют иной характер, чем в изотоническом растворе. Небольшая деполяризация развивается чаще всего вскоре после повышения осмолярности перфузирующего раствора. При воздействии ацетилхолина в концентрации

1×10^{-7} г/мл деполаризация почти не увеличивалась. Изменения сократительной активности (прекращение фазных сокращений и развитие тонического напряжения) гладкой мышцы воротной вены крысы вызывали увеличением осмолярности внеклеточной среды; в дальнейшем мышца не реагировала на действие ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл (рис. 2, А).

На фоне деполаризации, возникшей в гладкомышечных клетках вследствие действия гиперосмолярности, ацетилхолин в концентрации 1×10^{-6} г/мл вызывает небольшие осцилляции мембранного потенци-

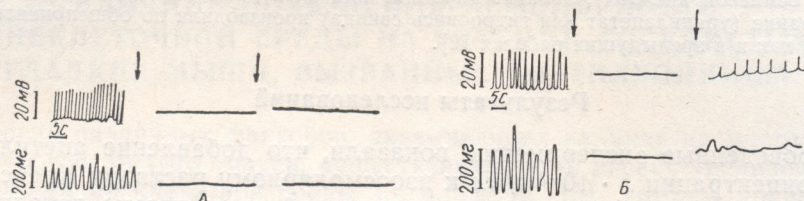


Рис. 2. Влияние ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл (А) и 1×10^{-6} г/мл (Б) на фоне воздействия раствора Кребса удвоенной осмолярности на спонтанную электрическую (верхние кривые) и сократительную (нижние кривые) активность гладкой мышцы воротной вены крысы. Слева — направо — исходная активность, воздействие раствора Кребса удвоенной осмолярности, воздействие ацетилхолина на фоне гиперосмолярного раствора Кребса. Линия со стрелкой — начало воздействия.

ала. Вслед за этими осцилляциями обычно развивается дополнительная деполаризация и появляются редкие пики электрической активности небольшой амплитуды. Тоническое напряжение гладкой мышцы воротной вены, вызванное увеличением осмолярности омывающего раствора, в ряде случаев даже несколько возрастает. Появляются редкие фазные сокращения небольшой амплитуды (рис. 2, Б).

При воздействии на препарат воротной вены крысы раствором Кребса, осмолярность которого повышена на 25%, наблюдается угнетение электрической и сократительной активности гладкой мышцы, однако значительно меньшее, чем в средах с повышенной в полтора и два раза осмолярностью. У ряда клеток снижалась амплитуда потенциалов действия, а некоторые клетки вовсе прекращали проявлять электрическую активность. Частота и амплитуда фазных сокращений уменьшались. Гиперосмолярность этой степени вызывала слабо выраженное тоническое напряжение гладкой мышцы.

Добавление в раствор Кребса повышенной на 25% осмолярности ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл вызывало большей частью увеличение частоты потенциалов действия (в 21 из 32 опытов) и их возобновление у тех клеток, у которых пиковая электрическая активность ранее была подавлена воздействием гиперосмолярности. Увеличивается амплитуда фазных сокращений гладкой мышцы воротной вены, достигая обычно исходной величины. Как правило, повышается тоническое напряжение мышцы. (рис. 3). Все же эти реакции существенно ослаблены по сравнению с вызываемыми ацетилхолином в той же концентрации в гладкой мышце воротной вены, находящейся в изоосмолярной среде (рис. 1, А).

При повышении осмолярности внеклеточной среды на 50% гладкая мышца воротной вены крысы реагирует на действие ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл, однако эти реакции выражены гораздо слабее, чем наблюдаемые в изоосмолярном растворе или растворе, осмолярность которого повышена на 25%. Повышение осмолярности раст-

вора Кребса на 15% не вызывало четких однонаправленных изменений электрической и сократительной активностей гладкой мышцы. Только в некоторых случаях (в 6 из 23) наблюдалось небольшое уменьшение амплитуды фазных сокращений гладкой мышцы в ответ на повышение осмолярности раствора Кребса на 15%. Реакции гладкой мышцы во-

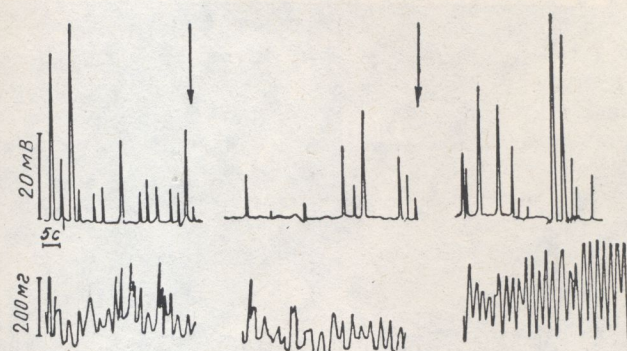


Рис. 3. Влияние ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл на фоне воздействия раствора Кребса повышенной на 25% осмолярности на спонтанную электрическую и сократительную активность гладкой мышцы воротной вены крысы.

Обозначения см. рис. 2.

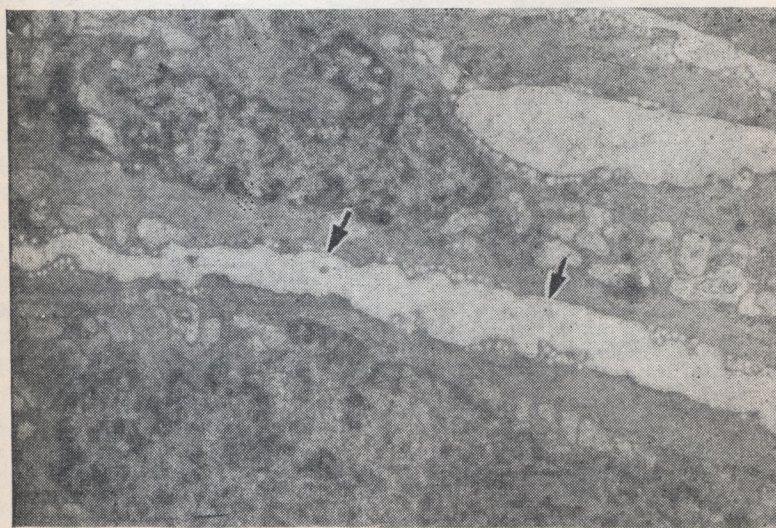


Рис. 4. Гладкомышечные клетки воротной вены крысы после инкубации в гипертоническом растворе.

Стрелками указаны места отсутствия базальной мембраны. Ув. $\times 7360$.

ротной вены на действие ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл при пребывании препарата в растворе Кребса повышенной (на 15%) осмолярности практически не отличаются от реакций, развивающихся в изоосмолярной среде.

Электронномикроскопические исследования влияния удвоенной осмолярности среды на ультраструктуру гладкомышечных клеток воротной вены крысы показали, что наибольшим изменениям при этом подвергаются такие структуры, как базальная и плазматическая мембра-

ны клетки и ядерная мембрана. Плазматическая мембрана у клеток после пятиминутного воздействия гипертонического раствора сморщивается (рис. 4, А). На микрофото видно, что при таком воздействии появляются многочисленные инвагинации плазматической мембраны, не наблюдаемые в обычных условиях в гладкомышечных клетках ворот-

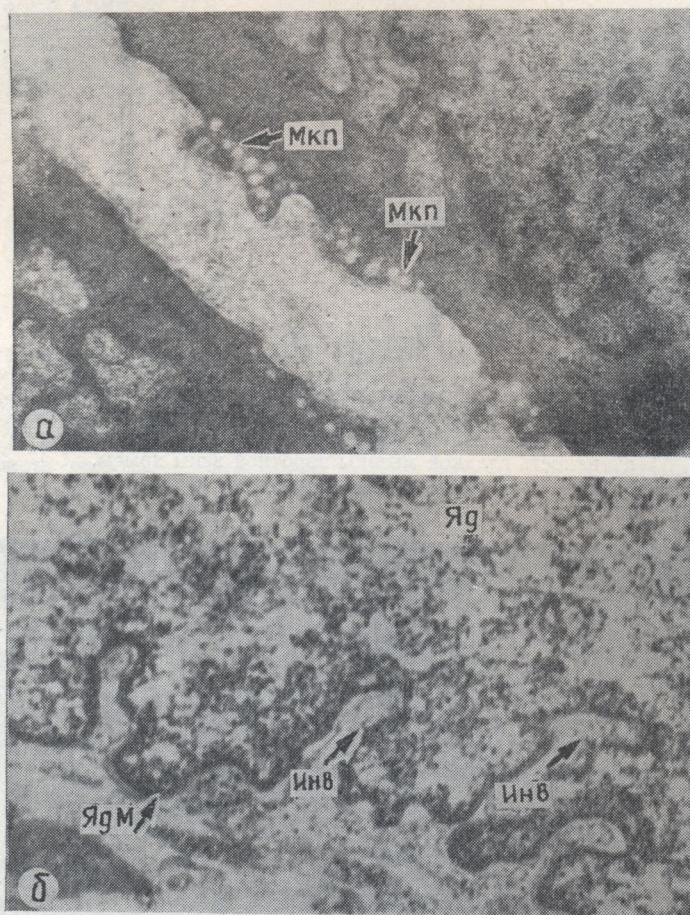


Рис. 5. Гладкомышечные клетки воротной вены после инкубации в гипертоническом растворе Кребса.
а — фрагмент клеточных мембран, б — фрагмент ядра: Мкп — микропиноцитозные пузырьки; Яд — ядро; ЯдМ — ядерная мембрана; Инв — инвагинации ядерной мембраны. Ув. $\times 29800$.

ной вены. Межклеточное пространство увеличено по сравнению с интактной мышцей. Можно наблюдать участки нарушений целостности базальной мембраны (рис. 4, Б). Возможно, что эти участки соответствуют нарушенным нексусам. Немаловажен также тот факт, что в клетках препаратов гладкой мышцы, подвергнутой воздействию гипертоничности, в области цитоплазмы, близко прилегающей к плазматической мембране, наблюдается резкое увеличение количества микропузырьков, которые расположены по всей периферии каждой клетки (рис. 5, А). Это свидетельствует о значительных изменениях в процессах микропиноцитоза в данных условиях. В ядерной мембране клеток препаратов, пребывавших перед фиксацией в гипертонической среде, также имеются глубокие инвагинации (рис. 5, Б).

Обсуждение результатов исследований

Результаты исследований свидетельствуют о существенных изменениях реактивной способности гладкой мышцы воротной вены крысы в условиях значительного повышения осмолярности внеклеточной среды.

Сопоставляя результаты действия ацетилхолина в концентрациях 1×10^{-7} г/мл и 1×10^{-6} г/мл в условиях резко повышенной осмолярности внеклеточной среды видно, что гиперосмолярность такого порядка является сильнодействующим фактором, под влиянием которого ослабляются медиаторные регуляторные воздействия. Реализация этих воздействий может осуществляться лишь при применении ацетилхолина в значительных концентрациях. Происходит это, по-видимому, вследствие того, что гиперосмолярность изменяет электрические характеристики гладкомышечных клеток воротной вены и нарушает взаимодействие клеток между собой. Проведение возбуждения в этих условиях возможно только через небольшое число нексусов, что согласуется с данными ряда исследователей [2, 4, 5, 9, 10].

В последующих сериях опытов изучали влияние на реактивность к ацетилхолину гладкой мышцы воротной вены перфузатов с осмолярностью, повышенной по сравнению с нормальной на 50, 25 и 15%.

Появление электрических и сократительных ответов гладкомышечных клеток воротной вены на ацетилхолин в концентрации 1×10^{-7} г/мл наблюдается при повышении осмолярности на 50%. В таких условиях исследуемые клетки реагируют на ацетилхолин, однако эти реакции слабо выражены и весьма отличаются от развивающихся под действием этого медиатора в изоосмолярном растворе.

Повышение осмолярности раствора Кребса, в который помещена полоска воротной вены крысы, на 25% приводит к изменениям реакций гладкомышечных клеток на воздействие ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл. Эти изменения состоят, в основном, в том, что увеличение частоты потенциалов действия и амплитуды фазных сокращений гораздо меньше, чем под воздействием медиатора на мышцу, находящуюся в изоосмолярном растворе. Таким образом, гладкомышечные клетки воротной вены, пребывая в среде, осмолярность которой на 25% выше нормальной, сохраняют способность реагировать на воздействие ацетилхолина небольших концентраций, однако их реакции ослаблены. Умеренное повышение осмолярности внеклеточной среды — на 25%, сопоставимо с встречающимися в организме, например, при интенсивной физической нагрузке или при воспалительных процессах различной этиологии.

Повышение осмолярности внеклеточной среды на 15% не вызвало четких однонаправленных изменений электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток воротной вены. В этих условиях не выявлено и изменений реакций сосудистой гладкой мышцы на действие ацетилхолина в концентрации 1×10^{-7} г/мл. Следовательно, можно считать, что в интервале повышения осмолярности перфузата от 15 до 25% влияние этого фактора наиболее сказывается на реакциях гладкой мышцы воротной вены на действие ацетилхолина. Дальнейшее увеличение осмолярности среды резко снижает чувствительность сосудистой гладкой мышцы к этому медиатору.

Увеличение осмолярности среды вдвое нарушает ультраструктуру гладкомышечных клеток воротной вены, при этом, кроме нарушений нексусов, отмеченных ранее, существенным изменениям подвергаются мембранные структуры. Целостность базальной мембраны нарушается. Возможно, эти участки соответствуют расположению нарушенных в

гиперосмолярной среде нексусов. Плазматическая мембрана сморщивается, усиливается микропиноцитоз. В контурах ядерной мембраны появляются глубокие инвагинации. Эти изменения ультраструктуры обратимы. Можно полагать, что изменения базальной и клеточной мембран играют существенную роль в том, что гладкая мышца воротной вены не в состоянии реагировать на действие ацетилхолина небольшой концентрации (1×10^{-7} г/мл) в среде, осмолярность которой вдвое выше нормальной.

Выводы

1. Повышение осмолярности внеклеточной среды на 25% приводит к изменениям электрических и сократительных реакций гладкомышечных клеток изолированной воротной вены крысы на ацетилхолин в концентрации 1×10^{-7} г/мл, которые состоят в основном в уменьшении выраженности реакций. Дальнейшее увеличение осмолярности среды резко снижает чувствительность сосудистой гладкой мышцы к этому медиатору.
2. Электрические и сократительные реакции гладкомышечных клеток изолированной воротной вены на ацетилхолин в концентрации 1×10^{-7} г/мл не изменяются при повышении осмолярности внеклеточной среды на 15%.
3. Одним из существенных изменений ультраструктуры гладкомышечных клеток воротной вены, выдержанной в течение 5 мин в растворе Кребса удвоенной осмолярности, является сморщивание плазматической и ядерной мембран, нарушение целостности базальной мембраны и усиление процессов микропиноцитоза.

Литература

1. Евдокимов И. Р., Майська О. Д. Электричні характеристики та скоротливі реакції гладкого м'яза легеневої артерії кролика в гіперосмолярному позаклітинному середовищі.— *Фізіол. журн. АН УССР*, 1976, 22, № 4 с. 488—494.
2. Евдокимов И. Р., Фролькис И. В.—Электричні та скоротливі реакції гладких м'язів воротної вени щура на підвищення осмолярності позаклітинного середовища.— *Фізіол. журн. АН УССР*, 1977, 23, № 2, с. 213—218.
3. Саттыбаева Р. К. Влияние гипертонического раствора глюкозы и NaCl на тонус венозных сосудов и венозное давление. Труды Ин-та физиологии КазССР, 1973, 18, с. 78—85.
4. Barr L., Berger V., Devey M. Electrical transmission at the nexus between smooth muscle cells.— *J. General Physiol.*, 1968, 51, N 3, p. 347—368.
5. Burnstock G. The autonomic neuromuscular junction.— *Proc. Internat. Union of Physiol. Sci.* 24 Internat. Congress. Washington, 1968, p. 6.
6. Cuparencu B., Ticsa S., Gentac V., Grosud M., Birsan E. Reflex and neuro-humoral pressor action of the hypertonic solution.— *Rev. roum. morphol., embriol., physiol., ser. physiol.*, 1977, 14, N 1, p. 7—14.
7. Funaki S., Bohr D. Electrical and mechanical activity of isolated vascular smooth muscle of the rat.— *Nature*, 1964, 203, p. 192—193.
8. Hemrich H., Biaster J. Localization of vascular adjustment in the intestinal vascular bed.— *Bibl. anat.*, 1973, N 11, p. 428—433.
9. Gurevich M. I., Bernstein S. A., Evdokimov I. R. The effect of changes in osmolarity and oxygen tension on excitability and conduction of excitation in vascular smooth muscle.— *Physiol. of smooth muscle*. / Edd. by E. Bulbring and M. Shuba. New York: Raven Press, 1976, p. 153—162.
10. Gurevich M. I., Evdokimov I. R., Frolikis I. V. On functional and morphological connections in vascular smooth muscles.— *Proc. of Int. symp. on physiol. and pharmacol. smooth muscles*.— *Bulg. Acad. Sci. Sofia*, 1977, p. 120—125.
11. Krishnamaty V., Adams H., Smitherman T., Willerson J. Influence of hyperosmolar mannitol on isolated arterial smooth muscle reactivity.— *Circulat.*, 1975, 52, N 4, p. 7—9.
12. McGrath M., Shepherd J. Hyperosmolarity—effect on nerves and smooth muscle of cutaneous veins.— *Amer. J Physiol.*, 1976, 231, N 1, p. 141—147.

13. Mellander S. Systemic circulation. Local control.—Ann. Rev. Physiol., 1970, 32, p. 313—337.
14. Nacaima A., Horn L. Electrical activity of single vascular smooth muscle fibres.—Amer. J. Physiol., 1977, 213, p. 25—30.
15. Steedman W. Micro-electrode studies on small mammalian arteries.—Bibl. anat. (Basel), 1967, N 8, p. 5—29.

Отдел физиологии кровообращения
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
12.VI 1978 г.

I. R. Evdokimov, I. V. Frolikis

THE INFLUENCE OF THE EXTRACELLULAR MEDIUM
OSMOLARITY INCREASE ON THE ACETYLCHOLINE-INDUCED
REACTIONS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES

Summary

The influence of the extracellular medium increased osmolarity on the reactions of a vascular muscle to cholinergic stimulation was studied on isolated preparations of the rat portal vein. It is shown that a two-fold increase in the extracellular medium osmolarity results in the failure of acetylcholine (1×10^{-7} g/ml) to induce either electric or contractile reactions of the rat portal vein smooth-muscle cells. A 25% increase in osmolarity evokes less pronounced changes as compared to the initial one. A 15% increase in osmolarity causes no significant changes in the reaction to acetylcholine. One of essential ultrastructural changes in the smooth-muscle cells of the rat portal vein exposed for 5 min to the Krebs solution of double osmolarity are besides nexus disturbances, plasma and nuclear corrugated membranes, the basal membrane intactness damage and intensification of py-nocytosis processes.

Department of Blood Circulation Physiology,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR., Kiev