

9. Савицкий И. В., Мардашко А. А., Попик Г. С. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в миокарде и скелетных мышцах животных при физической нагрузке // Укр. биохим. журн.— 1979.— № 1.— С. 45—49.
10. Страйер Л. Биохимия.— М.: Мир, 1985.— 308 с.
11. Усатенко М. С. Функциональные взаимоотношения изоферментов дегидрогеназ в интактных и денервированных мышцах кролика // Биохимия.— 1977.— 42, № 2.— С. 311—319.
12. Дончева А. В. О некоторых свойствах изоферментов малатдегидрогеназы коркового слоя почек крысы // Там же.— 1974.— 39, вып. 7.— С. 1172—1178.
13. Юрков Ю. А., Волкова Л. Д. Определение общей активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы // Лаб. дело.— 1973.— № 11.— С. 646—647.
14. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse.— Berlin: Akademieverlag, 1970.— 1976 S.
15. Hermansen L., Vaage O. Glyconeogenesis from lactate in skeletal muscle // Acta physiol. pol.— 1979.— 30, N 18.— P. 63—79.
16. Opie L., Newsholme E. The activities of fructose-1, 6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle // Biochem. J.— 1967.— 103, N 2.— P. 391—399.
17. Peuhkurinen K. Regulation of the tricarboxylic acid cycle pool size in heart muscle // J. Mol. and Cell. Cardiol.— 1984.— 16, N 6.— P. 487—495.
18. Plagemann P., Gregory K., Wroblewski F. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes // J. Biol. Chem.— 1960.— 235.— P. 2288—2293.

Одес. мед. ин-т им. Н. И. Пирогова
М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил в редакцию 17.05.88

УДК 612.73:663.64

В. П. Загороднюк, Е. Я. Баев, М. С. Яременко

Роль осмотического фактора в действии минеральной воды нафтуса на гладкие мышцы воротной вены

По имеющимся сообщениям [4—6], изолированные гладкие мышцы (ГМ) воротной вены крыс высоко чувствительны к химическим компонентам минеральной воды нафтуса. Внесение в среду инкубации ГМ нафтуса в очень малом объеме (0,1—0,5 % объема среды) вызывает достоверные изменения сократительной активности ГМ воротной вены. Отчетливо эти изменения проявляются при добавлении большого (1—5 % объема среды) объема минеральной воды. На этом основании делается вывод, что ГМ воротной вены крыс — весьма чувствительный и удобный объект для выявления в минеральных водах типа нафтуса очень малого количества биологически активных веществ. Следует, однако, заметить, что эффект минеральной воды может быть обусловлен не только ее химическими компонентами, но и действием на ГМ осмотического фактора, так как осмолярность нафтуса примерно в 10 раз ниже, чем раствора, в котором инкубируются препараты. Порог чувствительности ГМ воротной вены к изменениям осмолярности инкубационной среды пока не установлен. Известно только, что большие сдвиги концентрации осмотически активных веществ (на 20—50 % исходной) в сторону гипотоничности оказывают на ГМ выраженный возбуждающий эффект [7, 9]. Все это побудило нас оценить возможное влияние на ГМ осмотических сдвигов инкубационной среды, вызываемых добавлением в нее разного объема воды нафтуса, искусственного солевого аналога нафтуса (ИСАН) и дистиллированной воды.

Методика

Исследования электрической активности ГМ проводили с помощью модифицированного метода сахарозного мостика [1] на изолированных участках воротной вены крыс. Регистрацию сократительной активности ГМ осуществляли с помощью механотрона

6МХ4С. В некоторых экспериментах использовали ИСАН — искусственный аналог нафтуса, имеющий такой же, как нафтуса, макроионный состав, (ммоль/л): HCO_3^- — 7,4; Ca^{2+} — 2,6; Mg^{2+} — 2,0; SO_4^{2-} — 0,6; Cl^- — 1,0; Na^+ — 0,2; K^+ — 0,2.

Температуру растворов постоянно контролировали и поддерживали на уровне 34°C , а pH — 7,3—7,4.

Результаты

При замене раствора Кребса на аналогичный, содержащий 1 % его объема минеральной воды нафтуса (скважина 21-Н или 1-НО), наблюдается уменьшение амплитуды сокращений ГМ воротной вены в сред-

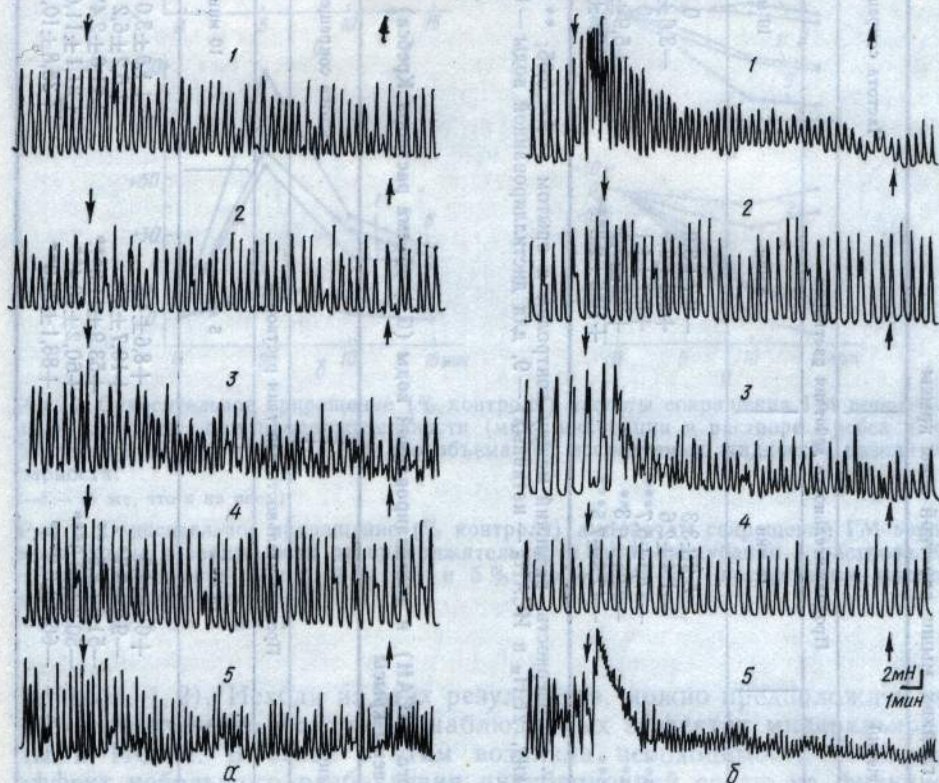


Рис. 1. Сократительная активность ГМ воротной вены крыс при добавлении к раствору Кребса 1 % (а) и 5 % его объема (б) следующих исследуемых жидкостей разной осмолярности:

1 — гипотонической нафтуса; 2 — изотонической нафтуса; 3 — гипотонического ИСАН; 4 — изотонического ИСАН; 5 — дистиллированной воды (стрелками указано начало и окончание действия жидкостей).

нем на $21\% \pm 4\%$ и недостоверное увеличение частоты сокращений. Типичный пример действия раствора Кребса, содержащего нафтусу, показан на рис. 1, а, 1. Аналогичный эффект вызывает раствор Кребса с добавлением 1 % его объема ИСАН (рис. 1, а, 3, табл. 1). Необходимо отметить, что тонус мышечных полосок воротной вены в присутствии минеральной воды или ИСАН в растворе Кребса существенно не изменяется. При добавлении 0,1—0,5 % объема раствора минеральной воды или ИСАН в инкубационный раствор не наблюдается достоверных изменений сократительной активности ГМ.

Добавление в раствор Кребса воды нафтуса из расчета 5 % объема раствора вызывает выраженное изменение сократительных свойств ГМ. Один из примеров этой серии опытов показан на рис. 1, б, 1. В первые минуты после замены раствора Кребса на аналогичный раствор с водой нафтусей наблюдается незначительное достоверное ($P < 0,001$) повышение тонуса мышечной полоски на 7—10 % исходного значения, увеличение частоты сокращений в среднем на $31\% \pm 6\%$ и уменьшение

Таблица 1. Влияние воды нефти (скважина 21-Н), ее солевого аналога (ИСАН) и дистиллированной воды (1 % объема раствора Кребса) на амплитуду ($\Delta M \pm m$) и частоту ($\Delta M \pm m$) сокращений гладких мышц воротной вены крысы

Растворы	Амплитуда сокращений			Частота сокращений		
	Продолжительность действия растворов					
	5 мин	10 мин	15 мин	5 мин	10 мин	15 мин
21-H _н	+1,4±2,4	-1,4±4,0	-5,2±3,3	-0,7±3,0	0	+0,7±3,3
ИСАН _н	-0,2±3,8	+2,8±2,8	-1,4±2,6	+2,2±2,9	-3,6±2,9	-1,5±2,9
21-H _н	-12,9±3,1***	-23,5±4,7***	-27,3±5,7***	+0,7±4,1	0	+4,8±7,6
ИСАН _н	-8,7±4,0*	-22,7±5,8**	-23,5±6,3**	+2,2±3,0	+5,9±3,7	+5,9±3,7
H ₂ O _д	-19,6±5,4***	-40,2±8,8***	-42,9±7,5***	+10,6±2,3***	+10,6±3,0**	+10,6±3,8*

Примечание. Здесь и далее звездочки при цифрах — достоверность различий между контролем и опытом (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001); число опытов (n) для растворов (21-Н_н и ИСАН_н — изотонических, 21-Н_н и ИСАН_н — нативных) — 9, для дистиллированной воды — 8.

Таблица 2. Влияние воды нефти, ее солевого аналога (ИСАН) и дистиллированной воды (5 % объема раствора Кребса) на амплитуду ($\Delta M \pm m$) и частоту ($\Delta M \pm m$) сокращений гладких мышц воротной вены крысы

Раствор	Амплитуда сокращений			Частота сокращений		
	Продолжительность действия растворов					
	5 мин	10 мин	15 мин	5 мин	10 мин	15 мин
21-Н _н	-3,3±3,1	-7,3±5,3	+0,4±4,9	+8,6±4,8	+1,0±3,0	-1,0±5,0
ИСАН _н	-10,1±3,0**	-17,5±3,2***	-9,2±3,7*	+10,7±8,0	+6,2±6,2	+2,7±3,6
21-Н _н	-15,8±5,3**	-46,4±8,8***	-51,6±8,5***	+53,9±11,8***	+21,6±2,4***	+18,6±6,9*
ИСАН _н	-25,2±9,2*	-47,6±10,2***	-50,3±10,0***	+60,2±18,4**	+31,1±11,6*	+20,4±9,7
H ₂ O _д	-21,3±8,1*	-57,6±8,6***	-66,4±6,9***	+88,1±22,0**	+35,8±10,1**	+23,8±11,9

амплитуды фазных сокращений на $37\% \pm 6\%$. Такое же воздействие на ГМ оказывает раствор Кребса при добавлении в него 5 % ИСАН (рис. 1, б, 3). Однако, как и в случае с добавлением 1 % объема (см. рис. 1, а, 2, 4), предварительное доведение минеральной воды и ИСАН до изотонии соответствующим количеством NaCl устраняет их влияние на частоту и амплитуду сокращений ГМ (рис. 1, б, 2, 4;

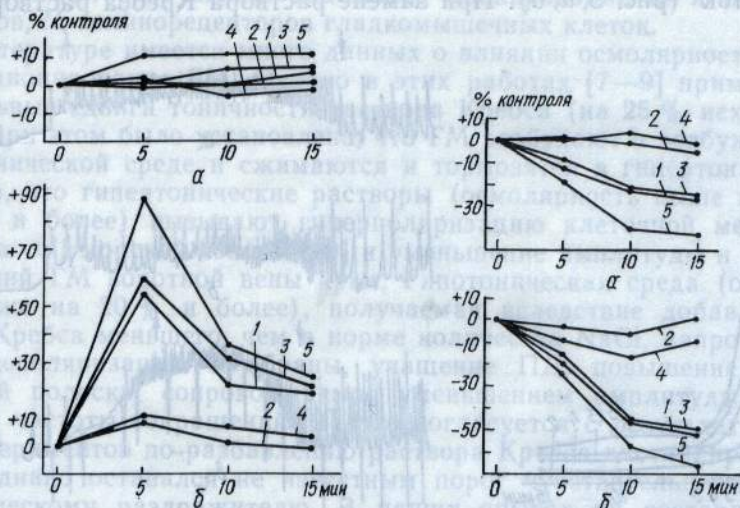


Рис. 2. Относительное приращение (% контроля) частоты сокращения ГМ воротной вены в зависимости от продолжительности (мин) инкубации в растворе Кребса при добавлении в него 1 % (а) и 5 % его объема (б) исследуемых жидкостей разной осмолярности:

1—5 — то же, что и на рис. 1.

Рис. 3. Относительное приращение (% контроля) амплитуды сокращений ГМ воротной вены крысы в зависимости от продолжительности (мин) инкубации в растворе Кребса при добавлении в него 1 % (а) и 5 % его объема (б) исследуемых жидкостей разной осмолярности:

1—5 — то же, что и на рис. 1.

см. табл. 1, 2). Исходя из этих результатов, можно предположить участие осмотического фактора в наблюдаемых эффектах минеральной воды и ИСАН. В связи с этим возникла необходимость исследовать эффект небольшого разбавления инкубационной среды на функционирование ГМ.

Внесение в раствор Кребса дистиллированной воды (1 % объема раствора) вызывает достоверное увеличение частоты сокращений в среднем на $15\% \pm 3\%$ и уменьшение амплитуды сокращений на $34\% \pm 7\%$ (см. рис. 1, а, 5). При добавлении в инкубационный раствор 5 % его объема дистиллированной воды наблюдается более выраженное изменение сократительной активности ГМ воротной вены, чем при добавлении соответствующих объемов минеральной воды и ИСАН (см. рис. 1, б, 1, 3, 5). В этом случае раствор Кребса в первые минуты действия вызывал увеличение тонуса мышечной полоски на $14\% - 17\%$ ($P < 0,001$) и частоты сокращений в среднем на $50\% \pm 14\%$, при этом амплитуда сокращений снижалась на $46\% \pm 7\%$ (табл. 1, 2). Соответствующие результаты влияния минеральной воды нафтуса, ИСАН и дистиллированной воды при их добавлении в раствор Кребса (1—5 % его объема) на сократительную активность ГМ воротной вены представлены в виде графиков на рис. 2, 3 и 4. Необходимо отметить, что добавление в инкубационный раствор (0,1—0,5 % его объема) дистиллированной воды, как и воды нафтуса и ИСАН, не вызывает достоверных изменений функционирования ГМ.

При одновременной регистрации электрической и сократительной активности ГМ воротной вены крыс с помощью метода сахарозного мостика проверяли, действительно ли воздействие на мышечную ткань

раствором Кребса при добавлении дистиллированной воды (1 % или 5 % его объема) можно говорить о возбуждающем действии, хотя амплитуда фазных сокращений при этом существенно уменьшалась (см. рис. 1, а, б, 5). Типичная электрическая активность ГМ воротной вены крыс состоит из медленных волн, на вершине которых генерируются потенциалы действия (ПД), вызывающие сокращение гладкомышечных клеток (рис. 5, а, б). При замене раствора Кребса раствором, раз-

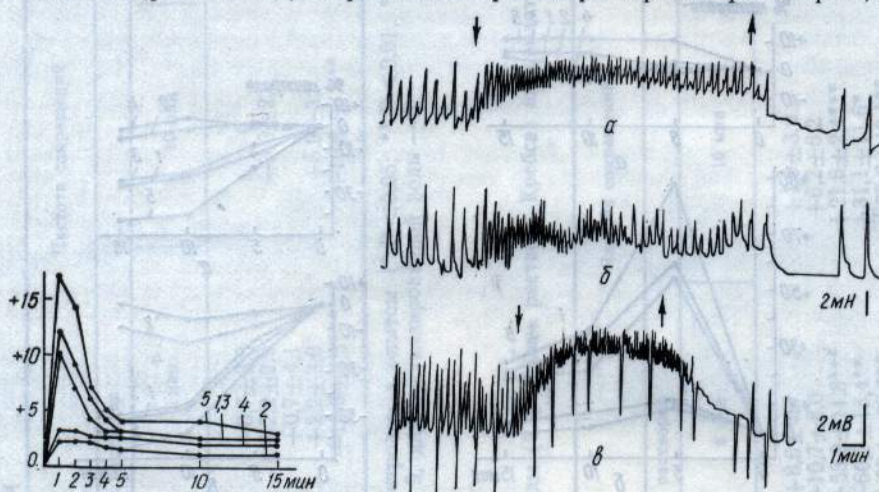


Рис. 4. Относительное приращение (% контроля) тонуса ГМ воротной вены крысы в зависимости от продолжительности (мин) инкубации в растворе Кребса при добавлении в него 5 % объема раствора исследуемых жидкостей разной осмолярности инкубационной среды: 1—5 — то же, что и на рис. 1.

Рис. 5. Электрическая (а) и сократительная (б) активности ГМ воротной вены крысы, а также вызванные аэлектротонические потенциалы (в) на фоне электрической активности при добавлении в раствор 5 % его объема дистиллированной воды.

бавленным дистиллированной водой (1 % или 5 % его объема), наблюдаются деполяризация мембраны и увеличение частоты медленных волн. При этом повышается тонус мышечной полоски и частоты сокращений. Необходимо отметить, что в этих условиях (деполяризация мембраны и увеличение частоты возникновения медленных волн) наблюдается генерирование меньшего числа ПД на гребне волны, что и приводит к уменьшению амплитуды фазных сокращений ГМ, имеющих в норме тетаническую природу. Наблюдаемая деполяризация мембраны ГМ до 4 мВ (при действии раствора Кребса, содержащего 5 % его объема дистиллированной воды) сопровождается незначительным снижением амплитуды аэлектротонических потенциалов (АЭП) лишь с течением времени его воздействия, тогда как в первые минуты амплитуда АЭП даже несколько увеличивается (см. рис. 5, в).

Изменения электрических свойств ГМ при действии раствора Кребса, содержащего 1 % его объема дистиллированной воды, аналогичны изменениям этих свойств ГМ при действии раствора Кребса, содержащего 5 % воды, но менее выражены.

Предварительное введение в раствор Кребса α - и β -адреноблокаторов — фентоламина и индерала ($3,1 \cdot 10^{-6}$ моль/л и $3,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л соответственно), а также М-холиноблокатора — атропина (1×10^{-6} моль/л) не оказывает влияния на возбуждающий эффект, вызванный в ГМ заменой раствора Кребса на разбавленный (1 % и 5 % его объема) дистиллированной водой, ИСАН и нафтусей.

Для проявления возбуждающего действия гипотонического раствора Кребса не обязательно сохранение целостности эндотелиальных клеток воротной вены, так как при их механическом повреждении этот эффект не исчезает.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о большой чувствительности гладкомышечных клеток воротной вены крыс к осмотическому фактору. Разбавление раствора Кребса дистиллированной водой (1 % его объема) вызывает отчетливое возбуждение ГМ, которое не исчезает при разрушении эндотелия, блокировании α - и β -адренорецепторов, М-холинорецепторов гладкомышечных клеток.

В литературе имеется много данных о влиянии осмолярности среды на функционирование ГМ. Однако в этих работах [7—9] применялись значительные сдвиги тоничности раствора Кребса (на 25 % исходной и более). При этом было установлено, что ГМ разбухают и возбуждаются в гипотонической среде и сжимаются и тормозятся в гипертонической. Показано, что гипертонические растворы (осмолярность выше на 25 % исходной и более) вызывают гиперполяризацию клеточной мембраны ГМ *taenia coli* морской свинки [10] и уменьшение амплитуды и частоты сокращений ГМ воротной вены крыс. Гипотоническая среда (осмолярность ниже на 20 % и более), получаемая вследствие добавления в раствор Кребса меньшего, чем в норме количества NaCl, напротив, вызывает деполяризацию мембраны, учащение ПД, повышение тонуса мышечной полоски, сопровождаемое уменьшением амплитуды и увеличением частоты сокращений [9], что согласуется с результатами наших экспериментов по разбавлению раствора Кребса дистиллированной водой. Однако оставался не известным порог чувствительности ГМ к гипотоническому раздражителю. В наших опытах он составлял 1 % исходного значения. Меньшее разбавление раствора Кребса не вызывало существенных изменений сократительной активности ГМ воротной вены крыс.

Существует мнение [7], что возбуждение ГМ в гипотонической среде является следствием уменьшения внутриклеточной концентрации ионов K, что приводит к изменению мембранного потенциала и соответственно сократительных свойств ГМ. Другие исследователи [9] наряду с этим фактом предполагают изменение и ионной проницаемости ГМ. Однако в этих работах не проводилось измерение общей ионной проводимости мембраны ГМ. В наших опытах не наблюдалось значительных изменений амплитуды АЭП при разбавлении инкубационного раствора (1—5 % его объема) дистиллированной водой. В первые минуты действия, на фоне деполяризации мембраны, амплитуда АЭП даже незначительно увеличивалась, что может быть связано с уменьшением K^+ -проводимости, вследствие снижения концентрационного градиента для K^+ . В дальнейшем сопротивление мембраны несколько уменьшалось, что, на наш взгляд, обусловлено ее деполяризацией, вызывающей увеличение ионных проводимостей. Вместе с тем механизм возбуждающего действия на ГМ при введении дистиллированной воды (1 % объема раствора) не совсем ясен и требует специального изучения.

При введении в раствор Кребса минеральной воды нафтуси или ИСАН (1—5 % объема раствора) наблюдается аналогичное возбуждающее действие, устраняемое добавлением NaCl до изотонии, т.е. эффект минеральной воды также связан с изменением тоничности инкубационной среды. Выраженность последнего несколько меньше, вследствие наличия в воде нафтуси и ИСАН солей (10 ммоль/л).

Представленные результаты позволяют утверждать, что предыдущие исследования [4—6], выполненные на препаратах воротной вены крыс по выявлению биологически активных компонентов воды нафтуси, проведены недостаточно корректно, так как не было контроля на сдвиг осмолярности среды.

Как показывают результаты наших исследований эффекты, наблюдаемые на ГМ воротной вены крыс в условиях *in vitro* при добавлении в раствор Кребса минеральной воды нафтуси, обусловлены не специфическим действием биологически активных компонентов этой воды, а прежде всего сдвигом осмолярности инкубационной среды в сторону