

О. В. Колчанова, В. И. Циркин

### Миоцитстимулирующая и миоцитингибирующая активность сыворотки крови крыс в фазе проэструса и метаэструса

В опытах с 78 продольными полосками рога матки 20 небеременных крыс показано, что характер влияния сыворотки их крови (в момент воздействия и после ее удаления) на спонтанную фазную сократительную активность тест-объекта зависит от фазы цикла и кратности разведения.

**Ключевые слова:** крысы, прогестерон, миоцитстимулирующая и миоцитингибирующая активность сыворотки крови.

O. V. Kolchanova, V. I. Tsirkin

### Myocytstimulatory and Myocytinhibitory Activity of Blood Serum Rats at Proestrus and Methaestrus

In experiences with 78 longitudinal strips of a uterus horn of 20 nonpregnant rats it is shown that character of influence of non-pregnant rats' blood serum (at the moment of influence and after its removal) on a spontaneous contractility activity of the test object depends on a phase of a cycle and its dissolution.

**Keywords:** rats, progesterone, myocytstimulatory and myocytinhibitory activity of blood serum.

Ранее в опытах с продольными полосками рога матки небеременных крыс, находящихся в фазе метаэструса или диэструса (в этих фазах полоски обладают устойчивой спонтанной фазной сократительной активностью, или СА), было показано, что сыворотка крови человека в определенных разведениях (1:10, 1:50, 1:100 и даже 1:500) повышает частоту и амплитуду спонтанных фазных сокращений, а в ряде случаев и базальный тонус, то есть проявляет хроно-, ино- и тонотропный эффекты, или миоцитстимулирующую активность [2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 14]. Эта активность объяснялась наличием в сыворотке крови так называемого эндогенного активатора сократимости миоцитов (ЭАСМ). В ряде случаев сыворотка проявляла противоположную активность, то есть снижала частоту и амплитуду фазных сокращений и базальный тонус, и это объяснялось наличием в сыворотке крови фактора, который первоначально был назван эндогенным бета-адреномиметиком, или ЭБМ [4, 8, 9, 11], а затем – эндогенным ингибитором сократимости миоцитов, или ЭИСМ [7, 10, 14, 15]. Однако природа, механизм действия и физиологическая роль ЭАСМ и ЭИСМ до настоящего времени не ясны. Высказаны лишь предположения о том, что 1) ЭАСМ и ЭИСМ отличаются по своей природе от известных гормонов; 2) механизм их действия связан с изменением входа  $Ca^{2+}$  внутрь

миоцитов и кардиомиоцитов; 3) они участвуют в регуляции деятельности сердечно-сосудистой и других систем организма и 4) они причастны к формированию артериальной гипертензии [3, 7, 14]. Недавно нами было установлено, что, подобно сыворотке крови человека, ЭАСМ-активность проявляет и сыворотка крови крыс [6]. С учетом того, что вопрос о природе ЭАСМ и ЭИСМ, месте их продукции и регуляции не изучен, в работе была поставлена цель – оценить способность сыворотки крови небеременных крыс изменять сократительную активность продольных полосок рога матки в зависимости от фазы эстрального цикла, то есть от уровня половых гормонов. Так как у крыс уровень эстрогенов достигает максимума в проэструсе, а уровень прогестерона – в метаэструсе [12, 17], то мы посчитали корректным исследовать сыворотку крови крыс, находящихся в этих фазах.

#### Объекты и методы исследования

Исследовали кровь небеременных крыс, находящихся в фазе проэструса (n=10) и в фазе метаэструса (n=10). Кровь в объеме 4–5 мл забирали путем пункции сердца крыс, находящихся под эфирным наркозом. После свертывания ее подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 20 минут, а сыворотку разводили в растворе Кребса до соотношений 1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000, что эквива-

лентно 20, 10, 2 и 1 мкг сыворотки на мл раствора Кребса соответственно. Способность сыворотки крови проявлять миоцитстимулирующую или миоцитингибирующую активность оценивали в опытах с 78 продольными полосками (длиною 5–7 мм, шириною – 2–3 мм) рога матки 20 небеременных крыс, находящихся в фазе метаэструса или диэструса. Регистрацию СА полосок проводили на «Миоцитографе» (производство фирмы «Норис», Россия) по методике В. И. Циркина и соавт. [13] при 38°C, постоянной скорости перфузии раствора Кребса, равной 0,7 мл/мин, пассивной аэрации рабочей камеры и исходной нагрузке полосок, равной 500 мг (4,9 мН). Опыты проводили в три этапа. На 1-м этапе, длящемся 10–15 минут, полоску перфузировали стандартным раствором Кребса (рН=7,4), содержащим (мМ): NaCl – 136; KCl – 4,7; CaCl<sub>2</sub> – 2,52; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,6; NaHCO<sub>3</sub> – 4,7; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> – 11, до установления устойчивой спонтанной фазной СА. На 2-м этапе в раствор Кребса добавляли исследуемую сыворотку, доводя ее концентрацию до определенного уровня (20, 10, 2 и 1 мкг/мл), на 3-м этапе тест-объект отмывали от сыворотки, то есть вновь использовали стандартный раствор Кребса (при исследовании 1000-кратного разведения этот этап не проводился). Второй и третий этапы длились в пределах 10 минут каждый. При анализе механограмм оценивали суммарную СА, то есть сумму амплитуд фазных сокращений на 10-минутном интервале (мН/10), а для 2-го и 3-го этапов – еще и в процентах к фоновому уровню. Кроме того, определяли изменение базального тонуса на 2-м этапе опытов – в мН и в процентах к средней амплитуде фазных сокращений, регистрируемых на 1-м этапе опытов. В работе учитывали «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985). Фазы эстрального цикла у крысы определяли по картине влагилищного мазка [5].

Результаты опытов подвергнуты статистической обработке [1]. В тексте они представлены в виде средней и ошибки средней ( $M \pm m$ ). Различия между результатами оценивали с использованием критерия Уилкоксона (при сравнении эффекта сыворотки к фоновой активности) и считали их статистически значимыми при  $p < 0,05$  (в работе статистически значимые результаты отмечены символом «\*»).

### Результаты исследования

Установлено (рис. 1), что все продольные полоски рога матки, используемые в качестве тест-объектов, обладали устойчивой спонтанной фаз-

ной СА. В среднем на 10-минутном интервале они генерировали  $7,9 \pm 0,5$  сокращений, амплитуда которых достигала  $15,9 \pm 1,4$  мН, а суммарная СА составляла  $128,2 \pm 14,9$  мН/10 мин. Это соответствует данным литературы [12].

При исследовании сыворотки крови крыс, находящихся в фазе проэструса, установлено (рис. 1, панель А; рис. 2), что разведения 1:50 и 1:100 (соответственно 20 и 10 мкг сыворотки на мл раствора Кребса) проявляют хроно- и инотропные эффекты. Это выражалось в повышении суммарной СА соответственно до  $219,2 \pm 34,3$  %\* и  $177,9 \pm 31,1$  %\* от фоновой суммарной СА, то есть наблюдаемой на 1-м этапе опытов. Разведения 1:500 и 1:1000 (или 2 и 1 мкг сыворотки на мл раствора Кребса) не влияли на фазную СА – изменения суммарной СА (соответственно до  $157,4 \pm 29,6$  % и до  $140,6 \pm 24,6$  %) были статистически незначимы. Показано, что разведения 1:50, 1:100, 1:500 и даже 1:1000 в отдельных опытах повышали базальный тонус, как это, в частности, видно из рис. 1 (панель А) в отношении разведения 1:50. Однако в целом этот подъем тонуса при воздействии указанных разведений (соответственно на  $5,8 \pm 3,7$  %,  $3,1 \pm 2,6$  %,  $7,0 \pm 5,1$  % и  $0,7 \pm 0,7$  % от средней амплитуды фазных сокращений, наблюдаемых на 1-м этапе) был статистически незначим. При проведении 3-го этапа установлено, что удаление 50-, 100- и 500-кратных разведений сыворотки сопровождалось восстановлением СА до исходного уровня (до  $128,9 \pm 22,1$  %,  $117,5 \pm 32,8$  % и  $82,6 \pm 20,8$  % соответственно), то есть наблюдаемого на 1-м этапе опытов, так как различия между этими этапами не были статистически значимыми. Эффект удаления 1000-кратных разведений не исследовался.

Таким образом, можно утверждать, что сыворотка крови крыс, находящихся в фазе проэструса, оказывает обратимые положительные хроно-тропный, инотропный и, в определенной степени, тонотропный эффекты, то есть проявляет миоцитстимулирующую активность.

При исследовании сыворотки крови крыс, находящихся в фазе метаэструса, установлено (рис. 1, панель Б; рис. 2), что все четыре разведения (1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000) не меняют статистически значимо суммарную СА. Она составила соответственно  $118,8 \pm 26,0$  %,  $145,3 \pm 29,0$  %,  $135,0 \pm 26,6$  % и  $100,7 \pm 16,3$  % от фоновой суммарной СА, наблюдаемой на 1-м этапе опытов. Базальный тонус под влиянием этих разведений сыворотки также статистически значимо не изменялся, его повышение составило соответственно

6,1±3,4 %, 4,6±3,7 %, 7,4±5,3 % и 2,0±2,0 % от средней амплитуды фазных сокращений, наблюдаемых на 1-м этапе. Это означает, что сыворотка крови крыс, находящихся в фазе метаэструса, не проявляет миоцитстимулирующую активность. При проведении 3-го этапа установлено (рис. 1, панель Б, рис. 2), что удаление 50-кратного разведения сыворотки крови сопровождается снижением суммарной СА – до 53,4±10,1 %\* от исходного

уровня, наблюдаемого на 1-м этапе опытов. При удалении 100- и 500-кратных разведений также было отмечено снижение СА тест-объекта до 79,1±13,0 % и 78,5±12,8 % от исходного уровня соответственно, но данные различия оказались незначимыми. Все вышесказанное позволяет утверждать, что удаление сыворотки крови крыс, находящихся в фазе метаэструса, сопровождается проявлением миоцитингибирующей активности.

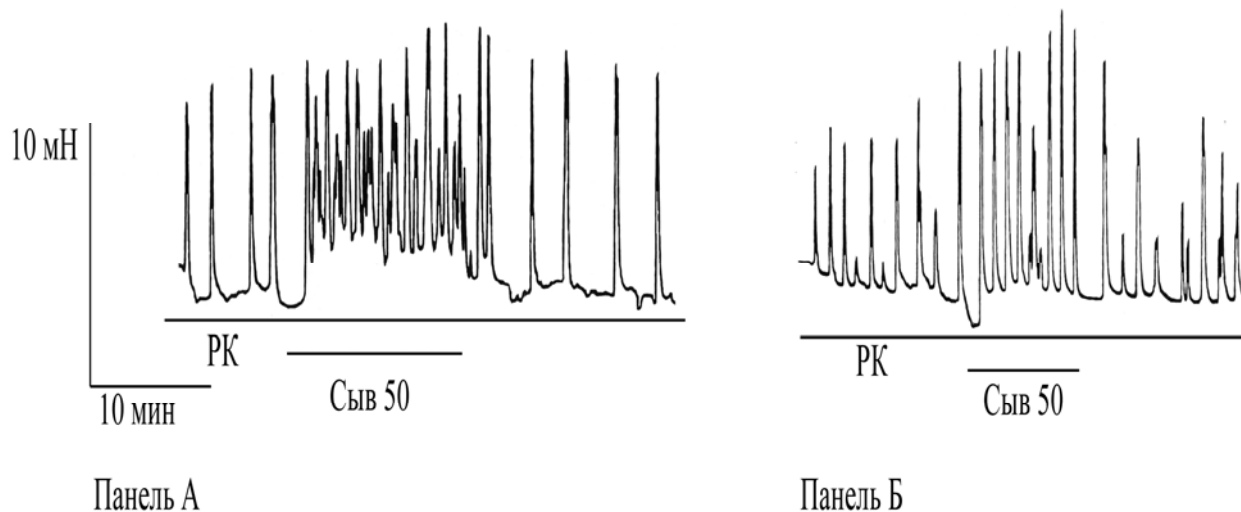


Рис. 1. Механограммы продольных полосок рога матки небеременных крыс, демонстрирующие хроно-, ино- и тонотропные эффекты сыворотки крови крыс, находящихся в фазе проэструса (панель А) и метаэструса (панель Б) в момент действия 50-кратного разведения сыворотки (Сыв 50) и после его удаления. РК – раствор Кребса. Калибровка 10 мН, 10 минут

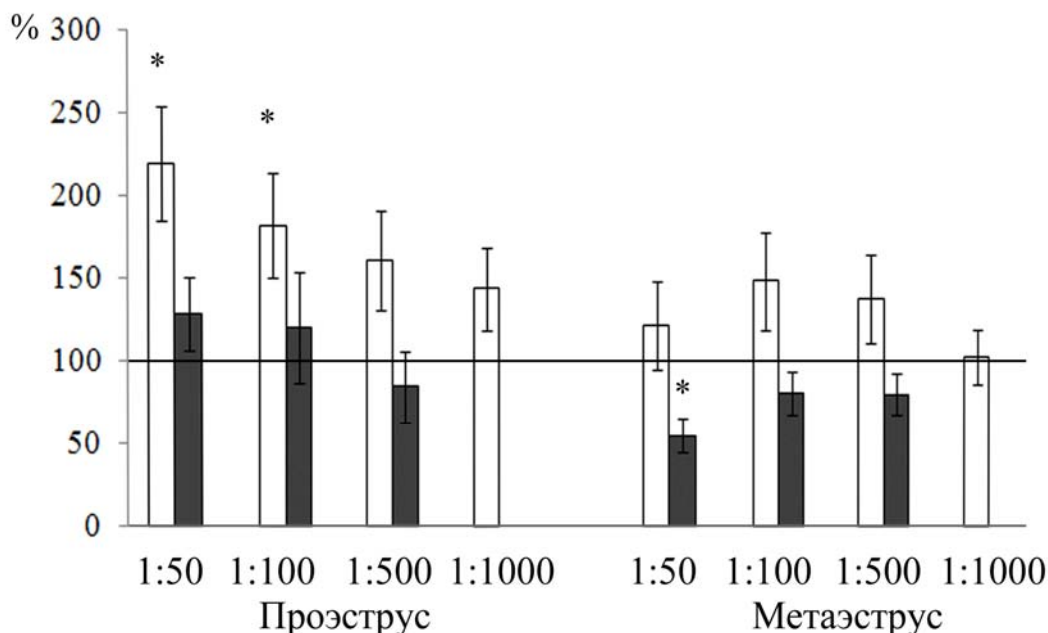


Рис. 2. Суммарная сократительная активность (в % к фоновому уровню) продольных полосок рога матки крыс при действии разведений 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 сыворотки крови крыс, находящихся в фазе проэструса и метаэструса (светлые столбцы) и после удаления сыворотки (темные столбцы). Символ «\*» означает, что различия с фоновым уровнем статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по критерию Уилкоксона. В опытах с 1000-кратными разведениями влияние удаления сыворотки не исследовалось

### Обсуждение результатов

В нашей работе впервые показано, что у крыс способность сыворотки крови проявлять миоцитстимулирующую и миоцитингибирующую активность зависит от фазы эстрального цикла, при которой получена кровь, то есть от уровня половых гормонов. В частности, установлено, что сыворотка крови крыс, находящихся в фазе проэструса, проявляет миоцитстимулирующую активность. С учетом данных литературы [12, 17] о том, что в фазе проэструса уровень эстрогенов высокий, а уровень прогестерона низкий, мы полагаем, что в этой фазе эстрального цикла в крови имеется высокий уровень ЭАСМ, но отсутствует ЭИСМ (или его мало), поэтому сыворотка крови проявляет миоцитстимулирующую активность. Очевидно, что для эффекта ЭАСМ не характерно последствие, так как удаление сыворотки крови, судя по результатам 3-го этапа опытов, сопровождается быстрым восстановлением исходной фоновой спонтанной СА.

Полагаем, что в фазе метаэструса, для которой характерен относительно высокий уровень прогестерона и низкий уровень эстрогенов [12,17], в сыворотке крови, наряду с ЭАСМ, содержится ЭИСМ. При воздействии на тест-объект сыворотки крови, полученной у крыс в фазе метаэструса, фоновая фазная СА не меняется существенно, так как эффекты ЭАСМ и ЭИСМ уравновешены, а при удалении сыворотки крови проявляется влияние ЭИСМ, для которого, в отличие от ЭАСМ, вероятно, характерен эффект последствия.

Учитывая полученные нами ранее данные о способности сыворотки крови самцов крыс проявлять миоцитстимулирующую активность в опытах с полосками миометрия крысы [6], полагаем, что продукция ЭАСМ, скорее всего, не регулируется половыми гормонами, в то время как продукция ЭИСМ регулируется ими, и в частности, повышается под влиянием прогестерона.

Ранее на примере опытов с продольными полосками рога матки крысы было показано, что способность сыворотки крови беременных женщин проявлять миоцитстимулирующую активность намного ниже, чем у небеременных женщин [4, 8, 9, 10, 14]. В аналогичных опытах нами также было показано, что сыворотка крови беременных крыс в меньшей степени проявляет миоцитстимулирующую активность, чем сыворотка небеременных [6]. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что прогестерон является фактором, повышающим продукцию ЭИСМ у

самок крыс и, вероятно, у женщин. С этих позиций полагаем, что у человека и животных при беременности, когда уровень прогестерона возрастает, повышается и продукция ЭИСМ, что, наряду с другими причинами, может приводить к торможению сократительной деятельности матки (СДМ).

Ранее, согласно теории прогестеронового блока А. Csapo [16], предполагалось, что прогестерон сам по себе блокирует спонтанную фазную СА миометрия беременных женщин и тем самым способствует вынашиванию беременности. В последующем было постулировано, что тормозное влияние прогестерона на сократительную деятельность матки (СДМ) обусловлено повышением под его влиянием синтеза бета<sub>2</sub>-адренорецепторов миометрия, и это послужило основой для формулирования гипотезы о ключевой роли бета-адренорецепторного ингибирующего механизма (бета-АРИМ) в торможении СДМ при беременности [12]. Результаты наших исследований показывают, что у прогестерона имеется еще один механизм, благодаря которому он тормозит СДМ при беременности. Этот механизм, вероятно, состоит в том, что прогестерон повышает продукцию ЭИСМ, который снижает спонтанную фазную СА и тем самым способствует торможению СДМ.

### Выводы:

1. Характер влияния сыворотки крови небеременных крыс (в момент воздействия и после ее удаления) на спонтанную фазную сократительную активность тест-объекта, то есть продольных полосок рога матки небеременных крыс, зависит от фазы цикла и кратности разведения.
2. Сыворотка крови крыс, находящихся в фазе проэструса, проявляет миоцитстимулирующую активность в разведениях 1:50 и 1:100.
3. Сыворотка крови крыс, находящихся в фазе метаэструса, при воздействии на тест-объект не проявляет миоцитстимулирующую активность ни в одном из исследованных разведений (1:50, 1:100, 1:500 и 1:1000), а после ее удаления 50-кратного разведения проявляет миоцитингибирующую активность.
4. Результаты исследования подтверждают представление о наличии в крови эндогенного активатора и эндогенного ингибитора сократимости миоцитов (ЭАСМ и ЭИСМ) и указывают на то, что уровень ЭИСМ возрастает под влиянием прогестерона.

Библиографический список

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
2. Гордина, В. З. Окситотическая и окситоциазная активность сыворотки крови у женщин во время беременности [Текст] / В. З. Гордина // Акушерство и гинекология. – 1991. – №4. – С.11–13.
3. Демина, Н. Л.  $\alpha$ - и  $\beta$ -адрено-, М-холиномодулирующая активность сыворотки крови при артериальной гипертензии [Текст] / Н. Л. Демина, В. И. Циркин, Е. И. Тарловская, Р. Ю. Кашин // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – № 2. – С. 16–22.
4. Джергения, С. Л. Гуморальные компоненты систем регуляции сократительной деятельности матки беременных женщин [Текст] : автореф. дисс. ... к. б. н. / С. Л. Джергения. – М. : РУДН, 1995. – 19 с.
5. Киршенблат, Я. Д. Практикум по эндокринологии [Текст] / Я. Д. Киршенблат. – М., 1969. – 256 с.
6. Колчанова, О. В., Циркин, В. И. Миоцитстимулирующая активность сыворотки крови крыс в зависимости от пола и этапа репродуктивного процесса [Текст] / О. В. Колчанова, В. И. Циркин // Физиология кровообращения : Сборник тезисов V Всероссийской школы-конференции. – М., 2012. – С. 80.
7. Коротаяева, К. Н. Влияние сыворотки крови человека на сократимость и  $\beta$ -адренореактивность изолированного миокарда человека [Текст] / К. Н. Коротаяева, В. А. Вязников, В. И. Циркин, А. А. Костяев // Физиология человека. – 2011. – Т. 37, № 2. – С. 1–9.
8. Помаскин, И. Н. Эндогенный  $\beta$ -адреномиметик как компонент  $\beta$ -адренорецепторного ингибирующего механизма [Текст] / И. Н. Помаскин, Б. И. Медведев, В. И. Циркин, В. В. Захаров // Акушерство и гинекология. – 1989. – № 6. – С. 23–27.
9. Помаскин, И. Н. Клинико-экспериментальная характеристика бета-адренорецепторного ингибирующего механизма у беременных и рожениц [Текст] : автореф. дисс. ... к. м. н. / И. Н. Помаскин. – Омск : ОГМИ, 1990. – 19 с.
10. Сизова, Е. Н. Физиологическая характеристика эндогенных модуляторов  $\beta$ -адрено- и М-холинореактивности и их участие в регуляции деятельности различных систем организма человека и животных [Текст] : автореф. дисс. ... д. б. н. / Е. Н. Сизова. – М. : РУДН, 2005. – 32 с.
11. Циркин, В. И.  $\beta$ -адреномиметический эффект сыворотки крови человека и животных [Текст] / В. И. Циркин и др. // Физиология человека. – 1997. – Т. 23, № 3. – С. 88–96.
12. Циркин, В. И. Сократительная деятельность матки (механизмы регуляции) [Текст] / В. И. Циркин, С. А. Дворянский. – Киров : КГМИ, 1997. – 270 с.
13. Циркин, В. И. Адреномодулирующие эффекты крови, ликвора, мочи, слюны и околоплодных вод человека [Текст] / В. И. Циркин и др. // Доклады РАН. – 1997. – Т. 352, № 1. – С. 124–126.
14. Циркин, В. И. Эндогенный активатор сократимости миоцитов и артериальная гипертензия [Текст] / В. И. Циркин и др. // Вятский медицинский вестник. – 2008. – № 1. – С. 55–66.
15. Циркин, В. И. Содержание в сыворотке крови эндогенных модуляторов адренореактивности и эндогенного активатора сократимости миоцитов как отражение их участия в регуляции артериального давления [Текст] / В. И. Циркин и др. // Вестник Санкт-Петербургского университета, сер. 3 (Биология). – 2008. – Вып. 2. – С. 69–82.
16. Csapo, A. Progesreone «block» [Текст] / A. Csapo // Am. J. Anat. – 1956. – V. 98, № 1–2. – P. 273–291.
17. Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat [Текст] / M. E. Freeman // In: E. Knobil & J. Nail (eds.). Physiology of reproduct. – New York.: Raven Press Ltd., – 1988. – P. 1893–1928.