

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

# РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 88, № 4  
апрель  
2002



Санкт-Петербург  
„НАУКА“

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНА F<sub>2a</sub> НА КЛЕТКИ  
АЛЬВЕОЛ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ**

© А. Г. Марков<sup>1</sup>, Е. Н. Парийская<sup>2</sup>, Ю. А. Толкунов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинский факультет, <sup>2</sup> Физиологический научно-исследовательский институт им. А. А. Ухтомского Санкт-Петербургского государственного университета, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

В исследованиях на лактирующих лабораторных мышьях анализировали влияние простагландина F<sub>2a</sub> на величину трансэпителиальной разности потенциалов и электрического сопротивления секреторного эпителия альвеол молочной железы. Простагландин F<sub>2a</sub> не оказывал влияния на исходный уровень трансэпителиальной разности потенциалов и сопротивления в альвеолах. Во всех опытах с предварительной аппликацией простагландина F<sub>2a</sub> в разных концентрациях (1 • 10<sup>-5</sup>—1 • 10<sup>-11</sup> моль/л) регистрировали достоверное увеличение амплитуды (до 31 ± 2%) и длительности (до 43 ± 3 %) ответной реакции на окситоцин. Простагландин F<sub>2a</sub> в концентрации 1 • 10<sup>-9</sup> моль/л вызывал уменьшение электрического сопротивления секреторного эпителия на окситоцин на 28 ± 2 %. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность участия простагландина F<sub>2a</sub> в развитии определенных этапов формирования состава молока.

**Ключевые слова:** молочная железа, простагландин F<sub>2a</sub>, секреторная клетка, окситоцин, трансэпителиальное сопротивление, трансэпителиальный потенциал.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 88. № 4. С. 503—509. 2002

**A. G. Markov, E. N. Pariskaya, Yu. A. Tolkunov.** EFFECT OF PROSTAGLANDINE F<sub>2h</sub> ON THE ALVEOLI'S CELLS OF THE MAMMARY GLAND. St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Universitetskaya Nab., 7/9, Russia.

In studies on lactating laboratory mice an influence of prostaglandine F<sub>2a</sub> on the value of transepithelial potential difference and resistance of the alveolar secretory epithelium in the mammary gland, was studied. Prostaglandine F<sub>2a</sub> did not affect initial level of transepithelial potential difference and resistance in alveoles. In all experiments with the preliminary application of prostaglandine F<sub>2a</sub> in different concentrations (1 • 10<sup>-5</sup>—1 • 10<sup>-11</sup> M) was registered a reliable increase in an amplitude (before 31 ± 2 %) and duration (before 43 ± 3 %) to return reactions on oxytocin. Prostaglandine F<sub>2a</sub> caused a reduction of transepithelial resistance in the alveolar secretory epithelium of first phase to return reaction on oxytocin on 28 ± 2 2 %. The data obtained indicate a possibility of participation of prostaglandine F<sub>2a</sub> in development of certain stages of shaping a composition of milk.

**Key words:** mammary gland, prostaglandine F<sub>2a</sub>, secretory cells, oxytocin, transepithelial potential difference, transepithelial resistance, lactation.

I. M. Sechenov Russian Physiological Journal, V. 88. N 4. P. 503—509. 2002

Как известно, клетки могут секретировать вещества (аутокоиды), оказывающие влияние на функциональное состояние их плазматических мембран и расположенных в них рецепторов. Это третий тип физиологической регуляции (помимо нервной и гормональной), при котором физиологически активное вещество образуется в клетке и после секреции влияет на ту же самую клетку [3]. Исследование механизмов аутокринной регуляции функций различных органов является актуальной задачей, так как аутокоиды изменяют чувствительность эфферентных клеток к действию ме-

диаторов и гормонов. Изучение процесса образования секрета в молочной железе свидетельствует о наличии аутокринной регуляции этого процесса [14<sup>15</sup>]. Известно, что концентрация простагландинов в женском молоке возрастает в начале лактации и остается повышенной по крайней мере в течение 3 мес [11]. Вместе с тем направленность влияния аутокоидов и прежде всего простагландина F<sub>2a</sub>, участвующего в усилении сократительных реакций гладких мышц матки [10], остается недостаточно изученной. В частности, в опытах на козах было показано, что под влиянием простагландина F<sub>2a</sub>, происходит уменьшение количества получаемого молока [13]. Можно предположить, что под влиянием аутокоидов происходит угнетение секреции молока [14<sup>15</sup>], однако подробных исследований, подтверждающих это на клеточном уровне, не проводилось. Влияние простагландинов на функции клеток может быть комплексным и затрагивать такие процессы, как транспорт ионов и воды. Это было показано в мочевом пузыре, в эпителии кожи лягушки, в клетках некоторых отделов почечных канальцев, деятельность которых регулируется нейрогормоном вазопрессинном [7<sup>8</sup>]. Сходный по структуре нейрогипофизарный гормон — окситоцин — оказывает влияние на образование секрета в молочной железе [12]. Целью данной работы явилось исследование влияния простагландина F<sub>2a</sub> на деятельность клеток альвеол молочной железы мышей.

#### МЕТОДИКА

Опыты были проведены на 27 белых мышах SHR (питомник «Рапполово», РАМН) массой 30—40 г на 10—15-й день лактации. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Для наркоза использовали раствор гексенала из расчета 0.1 мг/г массы тела, внутривенно.

Для оценки функций клеток альвеол применяли такие показатели, как изменение трансэпителиальной разности потенциалов и трансэпителиального электрического сопротивления, регистрацию которых проводили в соответствии с опубликованной ранее методикой [3]. Трансэпителиальная разность потенциалов отражает процессы транспорта и перераспределения ионов через железистый эпителий альвеол молочной железы [6<sup>9</sup>]. По изменению трансэпителиального сопротивления можно судить о появлении шунтирующего тока между полостью альвеолы и межклеточной жидкостью. Кроме того, изменение этого параметра может отражать развитие сократительной реакции, так как показано, что сокращение миоэпителиальных клеток приводит к увеличению трансэпителиального сопротивления [6]. Аппликацию веществ на поверхность молочной железы производили в следующей последовательности. После введения микроэлектрода в полость альвеолы осуществляли нанесение окситоцина, параметры реакции на который принимали в качестве контрольных. Затем последовательно апплицировали простагландин F<sub>2o1</sub> и простагландин F<sub>2a</sub> с окситоцином. Интервал между аппликациями составлял 5 мин.

После введения микроэлектрода регистрировали исходное значение трансэпителиальной разности потенциалов и электрического сопротивления. При нанесении веществ измеряли изменение уровня поляризации (амплитуду реакции) и длительность этой реакции, а также изменение трансэпителиального сопротивления. Для общей оценки реакции секреторного эпителия молочной железы на действие веществ использовали параметр «индекс реакции», который представляет собой площадь треугольника, высотой которого является амплитуда реакции, а основанием — ее длительность. Величину сопротивления секреторного эпителия до нанесения веществ на альвеолу рассчитывали в абсолютных величинах и принимали за 100%. Последующие изменения этого параметра выражали в процентах относительно исходного уровня.

Перфузию поверхности молочной железы осуществляли физиологическим раствором Рингера для теплокровных животных при pH 7.2—7.4 и температуре 37 °С. В опытах применяли следующие вещества: окситоцин («Гедон Рихтер», Венгрия) в концентрации 5 • 10<sup>-9</sup> моль/л, простагландин F<sub>2a</sub> («Chinoip», Венгрия) в диапазоне концентраций от 1 • 10<sup>-5</sup> до 1 • 10<sup>-11</sup> моль/л. Было проведено семь серий опытов, в каждой из которых использовали простагландин F<sub>2a</sub> в одной из концентраций.

Данные представлены в виде средней арифметической ± стандартная ошибка. Статистический анализ проводили методом сравнения совокупностей с попарно связанными вариантами. Достоверность отличий рассчитывали по (-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Влияние простагландина  $F_{2a}$  на трансэпителиальную разность потенциалов.* Секреторные клетки молочной железы имели исходный уровень трансэпителиальной разности потенциалов, равный  $23 \pm 1$  мВ ( $n = 174$ ). Минимальный потенциал равнялся 12 мВ, тогда как максимальный — 40 мВ. Потенциал со стороны апикальной мембраны (в полости альвеолы) был негативным относительно базальной части эпителия.

Известно, что в период лактации в молочной железе возрастает синтез простагландина  $F_{2a}$ , который в повышенных количествах секретируется в молоко [13]. Применение простагландина  $F_{2a}$  во всех концентрациях не вызывало изменения трансэпителиальной разности потенциалов, в том числе в альвеолах с низким и высоким исходными уровнями поляризации.

Возникло предположение, что простагландины могут оказывать модулирующее влияние на реакции, вызываемые нейrogормонами, в частности окситоцином, который, как известно, регулирует процессы образования и выделения молока [12]. Для проверки этого предположения перед применением окситоцина предварительно апплицировали простагландин  $F_{2a}$  в различных концентрациях. При нанесении окситоцина происходило увеличение поляризации эпителия до  $32 \pm 1$  мВ, длительность реакций составляла  $43 \pm 3$  с ( $n = 87$ ). Во всех проведенных сериях опытов при применении простагландина регистрировали увеличение параметров ответной реакции в альвеолах молочной железы по сравнению с реакцией при действии одного окситоцина (рис. 1, см. таблицу). Так, аппликация простагландина  $F_{2a}$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-11}$  моль/л увеличивала амплитуду реакции на окситоцин с  $10 \pm 1$  до  $13 \pm 1$  мВ, или на 23 %, а длительность реакции — с  $35 \pm 2$  до  $48 \pm 3$  с, или на 37 %. Увеличение концентрации простагландина  $F_{2a}$  с  $1 \cdot 10^{-10}$  до  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л вызывало

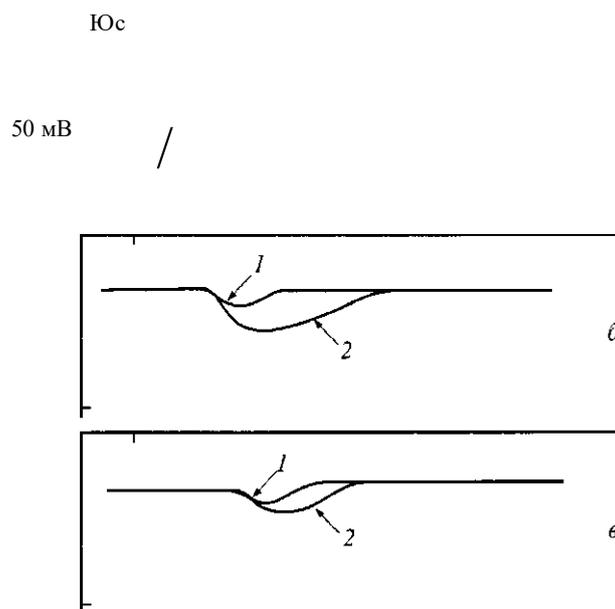


Рис. 1. Изменение трансэпителиальной разности потенциалов в альвеолах молочной железы мыши.

1 — окситоцин; 2 — окситоцин после предварительной аппликации простагландина  $F_{2a}$ . а — предварительная аппликация простагландина  $F_{2a}$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-11}$  моль/л; б — предварительная аппликация простагландина  $F_{2a}$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/л; в — предварительная аппликация простагландина  $F_{2a}$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Влияние окситоцина и простагландина F<sub>2a</sub> совместно с окситоцином на параметры ответной реакции секреторной клетки молочной железы мышей

№ серии	Испыгуемое вещество	л	Амплитуда реакции, мВ	Длительность реакции, с
1	о к	14	10 ± 1	35 ± 2
	ПГ(1 • 10 <sup>-11</sup> ) + о к	14	13 ± 2*	48 ± 3*
2	о к	14	10 ± 1	38 ± 2
	ПГ (1 • 10 <sup>-6</sup> ) + о к	14	13 ± 1*	53 ± 2***
3	о к	17	10 ± 1	42 ± 2
	ПГ(1 • 10 <sup>-9</sup> ) + о к.	17	13 ± 1**	58 ± 1***
4	о к	12	10 ± 1	42 ± 3
	ПГ (ЫО~ <sup>8</sup> ) + ОК	12	13 ± 1**	59 ± 3***
5	о к	11	10 ± 1	42 ± 8
	ПГ (1 • 10 <sup>-1</sup> ) + о к	11	13 ± 1*	58 ± 9**
6	о к	11	9 ± 1	46 ± 9
	ПГ (1 • Ю <sup>-6</sup> ) + о к	11	12 ± 1*	63 ± 8**
7	о к	8	10 ± 1	44 ± 4
	ПГ (1 • 10 <sup>-5</sup> ) + о к	8	12 ± 2*	62 ± 3*

Примечание. Концентрация простагландина F<sub>2o1</sub> представлена в моль/л. ПГ — простагландин F<sup>Λ</sup>; ОК — окситоцин. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 по сравнению с реакцией на окситоцин.

увеличение амплитуды реакции на окситоцин на 25, 30 и 31 % соответственно, а длительность реакции — на 37, 38 и 43 %. Предварительное применение простагландина F<sub>2a</sub> в концентрации 1 • Ю<sup>-7</sup>—1 • Ю<sup>-6</sup> моль/л приводило к достоверному увеличению амплитуды реакции на окситоцин на 28 и 29 % соответственно, а длительность ответной реакции увеличивалась на 38 и 36%. При применении простагландина F<sub>2a</sub> в концентрации 1 • 10<sup>-5</sup> моль/л регистрировали увеличение поляризации секреторного эпителия до 12 ± 2 мВ, или на 28 %, которое сохранялось в течение 62 ± 3 с. Таким образом, во всех опытах с предварительной аппликацией простагландина F<sub>2a</sub> (1 • Ю<sup>-11</sup>—1 • Ю<sup>-5</sup> моль/л) перед окситоцином отмечено достоверное увеличение амплитуды ответной реакции (до 31 %) и значительное (до 43 %) увеличение длительности реакции секреторных клеток.

Анализ изменения «индекса реакции» секреторных клеток альвеол молочной железы мышей показал, что величина этого параметра в ответ на воздействие окситоцина в разных сериях составляла от 178 до 215 мм<sup>2</sup> и не имела достоверных отличий (p > 0.05). В то же время по данному параметру четко прослеживался дозозависимый характер влияния простагландина F<sub>2A</sub> на секреторные клетки альвеол молочной железы (рис. 2). Применение простагландина F<sub>2H</sub> в концентрациях 1 • 10<sup>-11</sup>—1 • 10<sup>-10</sup> моль/л приводило к увеличению «индекса реакции» секреторных клеток, вызываемого действием окситоцина. Максимальный эффект достигался при концентрации простагландина F<sub>2A</sub> 1 • 10<sup>-9</sup> моль/л. Дальнейшее увеличение концентрации простагландина F<sub>2A</sub> не приводило к росту этого параметра. Стоит отметить, что увеличение «индекса реакции» происходило в пределах физиологических, а не фармакологических доз веществ.

*Влияние простагландина F<sub>2a</sub> на трансэпителиальное электрическое сопротивление.* Исходная величина трансэпителиального сопротивления в альвеолах составляла 183 ± 6 кОм {n = 34}. Известно, что в процессе изменения трансэпителиальной разности потенциалов на окситоцин сначала происходит уменьшение трансэпителиального сопротивления, а затем его увеличение [6]. Аппликация окситоцина в данных опытах также вызывала двухфазные изменения трансэпителиального сопротивления. Его величина в первой фазе составляла 149 ± 4 кОм, а во второй фазе равнялась 189 ± 6 кОм.

Для изучения влияния простагландина F<sub>2a</sub> на трансэпителиальное электрическое сопротивление была выбрана концентрация 1 • 10<sup>-9</sup> моль/л, так как это наименьшая

Рис. 2. Изменение «индекса реакции» на окситоцин при предварительном применении простагландина  $F_{2a}$ .

По оси абсцисс — концентрация простагландина  $F_{2a}$ , —  $\lg$ ; по оси ординат — «индекс реакции», мм<sup>2</sup>.

430

400 -

концентрация, при которой ответные реакции секреторного эпителия достигали максимума. Простагландин  $F_{2a}$  в этой концентрации не оказывал влияния на исходную величину трансэпителиального сопротивления. Количественные показатели не отличались от тех, которые регистрировались до начала применения простагландина  $F_{2a}$ . Предварительное применение простагландина  $F_{2a}$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/л в течение 30 с вызывало уменьшение электрического сопротивления секреторного эпителия альвеол в первой фазе на  $28 \pm 2\%$  ( $n = 34$ ).

На основании данных о влиянии простагландина  $F_{2a}$  на клетки миоэпителия [10] можно было также ожидать возникновение сократительной реакции миоэпителиальных клеток. С учетом того, что увеличение трансэпителиального сопротивления во второй фазе реакции на окситоцин обусловлено развитием сократительной реакции [6], можно оценить влияние простагландина  $F_{2a}$  на миоэпителиальные клетки по величине трансэпителиального сопротивления при сокращении альвеолы. Проведение исследования показало, что величины трансэпителиального сопротивления при действии окситоцина и его же после предварительного применения простагландина  $F_{2a}$ , а затем окситоцина не отличаются друг от друга. При действии окситоцина его величина возрастала на 3.2%, а при применении простагландина  $F_{2a}$  совместно с окситоцином — на 3.4% ( $n = 34$ ,  $p > 0.5$ ). К тому же сократительная реакция альвеол при нанесении окситоцина легко определяется визуально по изменению конфигурации альвеол, продвижению секрета, смещению пласта секреторной ткани. Однако не было отмечено никаких изменений в состоянии альвеол, продвижении секрета, смещении ткани при нанесении простагландина  $F_{2a}$ . Следовательно, применение простагландина  $F_{2a}$  не вызывает развития сократительной реакции миоэпителиальных клеток альвеол молочной железы.

Известно, что уменьшение содержания аутокоидов в тканевой среде возможно при частой смене физиологического раствора [7, 8]. В мочевом пузыре лягушки это приводило к резкому увеличению осмотической проницаемости, в то время как добавление в окружающую среду простагландин, в частности  $F_{2a}$ , снижало осмотическую проницаемость. В наших исследованиях, благодаря непрерывной перфузии поверхности молочной железы физиологическим раствором, происходило постоянное удаление простагландин из тканевой среды. Исследования показали, что на этом фоне добавление в перфузионный раствор простагландина  $F_{2a}$  в широком диапазоне концентраций не вызывало изменений уровня трансэпителиальной разности потенциалов и сопротивления в секреторном эпителии альвеол молочной железы. Кроме того, можно полагать, что тестирование действия окситоцина на секреторные клетки происходило при пониженном содержании аутокоидов в тканевой среде. Добавление простагландина  $F_{2a}$  оказывает модулирующее влияние на чувствительность секреторных клеток к окситоцину. Учитывая, что простагландин  $F_{2a}$  не вызывает развития сократительной реакции миоэпителиальных клеток, изменения трансэпители-

370

340

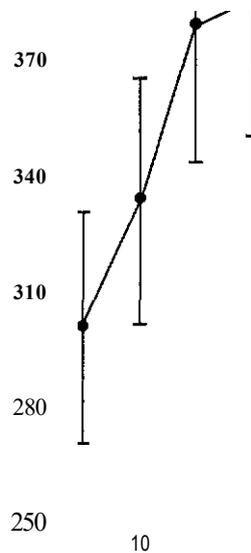
310

280

250

10

7



ального потенциала и сопротивления связано с его влиянием на деятельность секреторного эпителия молочной железы.

Влияние простагландина  $F_{2a}$  на реакции, вызываемые окситоцином, развивалось достаточно быстро. Оказалось достаточным 30 с его применения для того, чтобы зарегистрировать изменения трансэпителиальной разности потенциалов и сопротивления, вызываемые действием окситоцина. Общей закономерностью для всех млекопитающих является изотоничность молока и плазмы крови [3]. При аппликации окситоцина происходит экструзия белковых гранул [4], увеличение активности ионов калия в полости альвеол [5]. Таким образом, в полости альвеол повышается количество осмотически активных компонентов.

Формирование секрета в полости альвеолы включает в себя процессы, связанные с поддержанием постоянного осмотического давления. Перераспределение ионных потоков, осмотической проницаемости должно быть направлено на поддержание концентрационного градиента, при котором происходит поддержание изотоничности молока по отношению к плазме крови. Прежде всего такая компенсация может происходить за счет электролитов молока. Система транспорта натрия имеет стержневое значение в функциональной организации ассиметричных клеток [2]. Известно, что под влиянием простагландина  $F_{2a}$  происходит снижение концентрации ионов  $Na^+$  в молоке [13]. В опытах установлено, что величина трансэпителиального сопротивления при действии простагландина  $F_{2a}$  не падает до нуля, свидетельствуя об отсутствии тока короткого замыкания. Значит, транспорт ионов натрия осуществляется не по межклеточному пути, а связан с деятельностью секреторных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о роли простагландина  $F_{2a}$  в модуляции ответа секреторного эпителия альвеол на окситоцин, что, по-видимому, обусловлено изменением ионной проницаемости мембран клеток. Таким образом, можно предположить, что простагландин  $F_{2c}$  участвует в регуляции определенных этапов формирования состава молока.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] **Наточин Ю. В.** Некоторые вопросы функциональной эволюции осморегулирующих органов и желез внешней секреции. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 3(6): 555—562. 1967.
- [2] **Наточин Ю. В.** Проблемы эволюционной физиологии водно-солевого обмена. Л. Наука. 1984.
- [3] **Наточин Ю. В.** Новое о природе регуляций в организме человека. Вестник РАН. 70(1): 21—35. 2000.
- [4] **Попов С. М.** Клеточные механизмы регуляции секреторного процесса в молочной железе. Л. Изд-во ЛГУ. 1989.
- [5] **Толкунов Ю. А.** Ионная зависимость гиперполяризационных изменений мембранного потенциала секреторных клеток молочной железы. Физиол. журн. СССР. 75(4): 567—574. 1989.
- [6] **Толкунов Ю. А., Марков А. Г.** Физиология секреторных клеток молочной железы. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 86(8): 1057—1065. 2000.
- [7] **Шахматова Е. И., Пруцкова Н. П., Наточин Ю. В.** Исследование эффективности простагландинов и простаглицлина в снижении осмотической проницаемости мочевого пузыря лягушки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 83(11—12): 168—172. 1997.
- [8] **Шахматова Е. И., Кузнецова А. А., Пруцкова Н. П., Боголенова А. Е., Наточин Ю. В.** Исследование ингибиторов циклооксигеназы на транспорт ионов и воды в почке человека, коже и мочевом пузыре лягушки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 83(12): 68—75. 1997.
- [9] **Blatchford D. R., Peaker M.** Effect of ionic composition of milk on transepithelial potential in the goat mammary gland. J. Physiol. (L.). 402 : 533—541. 1988.
- [10] **Engstrom T., Bratholm P., Christensen N. J., Vilhardt H.** Effect of oxytocin receptor blockade on rat myometrial responsiveness to prostaglandin  $F_{2a}$ . Biol. Reprod Nov. 63(5): 1443—1449. 2000.
- [11] **Hawkes J. S., Bryan D.L., James M. J., Gibson R. A.** Cytokines (IL-1beta, IL-6, TGF-beta1 and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. Pediatr. Res. 46(2): 194—199. 1999.

[12] **Markov A. G., Ruhle H.-J.** Influence of exogenous oxytocin on labelling of secretory epithelium of mouse mammary gland by  $H^3$ -leucine, evidenced by autoradiography. *Exp. Clin. Endocrinol.* 100(3): 112—116. 1992.

[13] **Maule Walker, PeakerM.** Local production of prostaglandins in regulation to mammary function at the onset of lactation in the goat. *J. Physiol. (L.)*. 309 : 65—79. 1980.

[14] **Wilde C. J., Addey C. V. P., Boddy L. M., PeakerM.** Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305:51—58. 1995.

[15] **Wilde C. J., Addey C. V. P., Peaker M.** Effects of immunization against an autocrine inhibitor of milk secretion in lactating goats. *J. Physiol. (L.)*. 491 :465—469. 1996.

Поступила 9 XI 2001