

612
Б 799

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

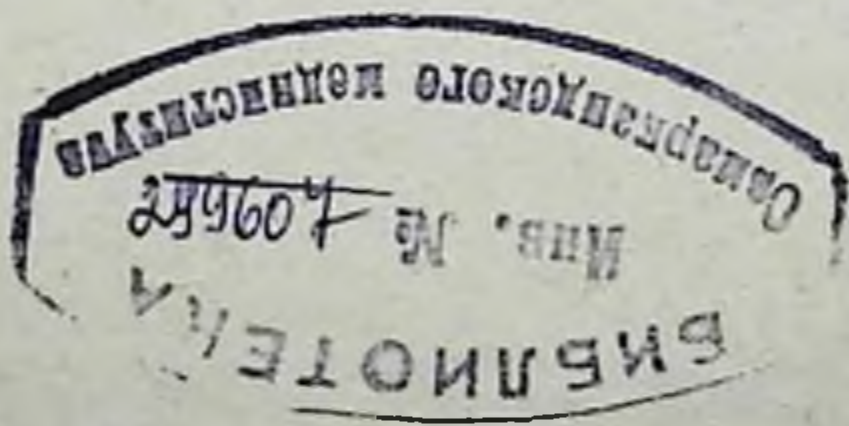


612
5799

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Под редакцией проф. Б. А. Кудряшова

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебного пособия
для студентов вузов,
обучающихся по специальности
«Биология»



Москва • Высшая школа • 1984

ББК 28.903

Б79

УДК 612

И. П. Баскова, Г. С. Ипполитова, Н. А. Келарева,
Г. Н. Копылова, Т. В. Лелекова, Г. Д. Матарадзе,
М. М. Никитина, И. Ф. Прудникова, В. Б. Розен,
Г. Е. Самонина, Ц. В. Сербенюк, А. Н. Смирнов,
О. В. Смирнова, Н. А. Соколова, Г. С. Сухова,
М. Г. Удельнов, С. А. Чепурнов, Н. Е. Чепурнова,
Л. И. Чудаков, Г. Ю. Юрьева

Рецензенты:

кафедра нормальной физиологии II Московского государственного медицинского института им. Н. И. Пирогова (зав. кафедрой проф. Г. И. Косицкий);

кафедра физиологии человека и животных Латвийского государственного университета им. П. Стучки (зав. кафедрой доц. А. Илзинь)

Б79 Большой практикум по физиологии человека и животных: Учеб. пособие для вузов по спец. «Биология» /И. П. Баскова, Г. С. Ипполитова, Н. А. Келарева и др.; Под ред. Б. А. Кудряшова. — М.: Высш. шк., 1984. — 407 с., ил.

В пер.: 1 р. 50 к.

Цель пособия — помочь студентам освоить методы и оперативно-технические приемы исследования физиологических функций на клеточном, молекулярном, органном и организменном уровнях, овладеть важнейшими навыками проведения эксперимента и его обработки. Книга включает разделы: электронные приборы в электрофизиологии, физиология нервов и мышц и общая электрофизиология, физиология ЦНС, рецепция раздражений, физиология кровообращения, физиология пищеварения, эндокринология, физиология и биохимия факторов свертывания крови.

Б 2007020000—326 101—84
001(01)—84

ББК 28.903

57.04

© Издательство «Высшая школа», 1984

ПРЕДИСЛОВИЕ

Физиология человека и животных, как и другие биологические науки, изучает мир живой природы и способствует формированию у студентов диалектико-материалистических взглядов, убежденности в истинности человеческого познания, в преобразующей силе человеческой практики. Возникнув как описательная наука, физиология в XX в. превратилась в науку экспериментальную. Она вооружилась современными методами исследования с применением точной, тонкой, непрерывно совершенствующейся аппаратуры, широко использующей достижения физики, электроники, вычислительной техники. По мере развития технических средств регистрации и возможности вмешательства в организм главным способом физиологического исследования становится эксперимент, расширяющий и углубляющий знания о жизнедеятельности органов и систем организма человека и животных.

Дальнейшее изучение физиологии может и должно обеспечить выполнение теоретических и прикладных работ в этой области естествознания, что является основой развития медицины, педагогики, психологии, ветеринарии, животноводства и др.

Изучение физиологии в высшем учебном заведении должно непременно сопровождаться выполнением студентами лабораторных работ, в ходе которых они получают непосредственное подтверждение теоретическим положениям, осваивают современные методы физиологических исследований, приобретают навыки в постановке и проведении различных экспериментов.

Настоящее руководство создано на основе программы занятий большого практикума по физиологии человека и животных для студентов, специализирующихся по физиологии на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. Коллектив авторов исходил из того, что большой практикум по физиологии является важнейшим этапом в современной системе подготовки будущего специалиста-физиолога. На большом практикуме студенты должны:

- 1) освоить методы и технические приемы исследований физиологических функций; как классические методики, сохранившие значение до наших дней, так и самые современные физико-химические методы анализа на клеточно-молекулярном, органном и организменном уровнях организации биологических систем;

- 2) овладеть важнейшими навыками проведения эксперимента и его обработки (уметь грамотно проводить эксперимент, четко пред-

ставляя цель исследования и адекватность метода, правильно подбирать контрольные формы опыта; знать приемы работы с соответствующей аппаратурой, научиться различным формам иллюстративного выражения полученных в эксперименте результатов — построению графиков, гистограмм, составлению таблиц и т. д., освоить методы статистической обработки результатов);

3) глубже усвоить теоретический материал соответствующего раздела физиологии, который преподается в теоретическом курсе.

Программу большого практикума, предлагаемого в руководстве, составляют разделы физиологии, отражающие научные направления кафедры и отвечающие современному уровню развития физиологии человека и животных. Подавляющее большинство экспериментальных задач является оригинальным и разработано преподавателями и научными сотрудниками кафедры физиологии человека и животных МГУ.

Настоящая книга состоит из 8-ми разделов. Сначала следуют разделы: электронные приборы в электрофизиологии, физиология нервов и мышц, общая электрофизиология, физиология центральной нервной системы, рецепция раздражений; затем — физиология кровообращения, пищеварения, эндокринология и физиология и биохимия свертывания крови.

Книга «Большой практикум по физиологии человека и животных» начинается с раздела «Электронные приборы в физиологии», где изложены принципы и основные характеристики различного рода электронных устройств, составляющих основу современных электрофизиологических установок.

Следующий раздел «Физиология нервов и мышц и общая электрофизиология» имеет задачей не только дать студентам навыки экспериментальной работы, но и познакомить их с основными понятиями физиологии возбудимых клеток: мембранным потенциалом, потенциалом действия, проведением возбуждения, синаптической передачей и др.

На практических занятиях по физиологии центральной нервной системы студенты исследуют природу процессов, протекающих в головном и спинном мозге с помощью современных методов регистрации биотоков мозга и вызванных ответов, изучают фундаментальные процессы возбуждения и торможения коры и подкорковых образований головного мозга, обеспечения центральной координации движений. На теплокровных животных они осваивают также стереотаксические приемы исследований мозга, способы применения различных видов наркоза обезболивания.

Раздел «Рецепция раздражений» на основе электрофизиологического метода исследования знакомит студентов с общими закономерностями работы механо- и хеморецепторов.

Раздел «Физиология кровообращения» включает ряд экспериментальных задач, позволяющих понять основные закономерности деятельности сердечно-сосудистой и лимфатической систем. В качестве примера предлагается провести разностороннее изучение процессов нервной регуляции сердца.

Возможность освоить методы изучения работы пищеварительных желез, приемы острых и хронических операций на желудочно-кишечном тракте теплокровных животных студенты получают в разделе практикума «Физиология пищеварения».

Практические занятия, посвященные эндокринной системе, включают изучение анатомии, гистологии и физиологии эндокринных желез, знакомят студентов с современным комплексным методом определения гормонов в биологических жидкостях. В руководстве рассмотрен перспективный в настоящее время принцип сатурационного анализа гормонов, к которому относятся широко применяемые радиоиммунологические методы.

Впервые на уровне большого практикума разработаны задачи по биохимии свертывания крови и физиологической регуляции этого процесса. На занятиях студенты осваивают методы выделения и анализа белков, специфических для системы свертывания крови.

Опыт показывает, что предлагаемая авторами последовательность изучения разделов физиологии и проверенный педагогической практикой объем экспериментальных задач позволяет студентам приобрести необходимые навыки экспериментальной работы и теоретические знания в пределах часов, отводимых на занятия большого практикума учебным планом. Задачи каждого раздела учат молодых специалистов комплексному подходу к изучению физиологических функций.

Каждому разделу практикума и отдельным задачам предшествуют теоретические введения по конкретным рассматриваемым в эксперименте проблемам, что облегчает подготовку к выполнению задач, а также позволяет понять специфику соответствующего экспериментального исследования. Теоретические введения подготовлены с учетом того, что отдельные вопросы в настоящее время еще не изложены в полной мере в доступных студентам учебниках и руководствах.

По опыту проведения занятий на кафедре задачи выполняются группами студентов по 2—4 человека. После выполнения основной задачи преподаватель предлагает дополнительное исследование. Поскольку разработано несколько дополнительных задач, разные группы студентов выполняют различные опыты. В заключение работы по каждому разделу проводится отчетная конференция с докладами студентов об итогах проведенной работы с разбором результатов и теоретических вопросов, относящихся к проведенным экспериментам.

Предлагаемое руководство — учебное пособие для студентов и аспирантов университетов, педагогических и сельскохозяйственных вузов, специализирующихся по физиологии человека и животных. Оно может быть рекомендовано для преподавания физиологии в медицинских институтах и с успехом использоваться специалистами смежных областей науки: биофизиками, биохимиками, нейропсихологами, зоологами, ветеринарами.

Распределение текста между авторами по разделам указано в оглавлении. Авторы будут благодарны за рекомендации и замечания, способствующие улучшению содержания книги.

Авторы

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ЗАДАЧ

Приготовление растворов Рингера, используемых на практикуме

Раствор Рингера для холоднокровных. Приготавливают следующие маточные растворы: 4 М раствор NaCl , 1 М раствор KCl , 1 М раствор CaCl_2 , 1 М раствор NaHCO_3 . Затем на 1 л раствора берут: NaCl — 6,5 г, или 27,75 мл 4 М раствора, KCl — 0,14 г, или 2 мл 1 М раствора, CaCl_2 — 0,13 г, или 1,2 мл 1 М раствора, NaHCO_3 — 0,2 г, или 2,4 мл 1 М раствора. Порядок растворения: сливают (или всыпают) в бутыль рассчитанные количества NaCl , KCl и CaCl_2 , добавляют почти все количество дистиллированной H_2O и тщательно перемешивают, в последнюю очередь вносят NaHCO_3 и доливают оставшееся количество воды. Такой порядок растворения помогает избежать выпадения в осадок солей Ca .

Раствор Рингера для теплокровных. На 1 л раствора берут 9 г NaCl , 0,3 г KCl , 0,2 г CaCl_2 , 0,2 г NaHCO_3 и 10 г глюкозы. Порядок растворения тот же. В ряде задач для теплокровных используют физиологический раствор — 0,85%-ный раствор NaCl .

Приготовление фоторастворов, используемых на практикуме

Проявитель для пленки (кроме РФ). Время проявления 3—4 мин. На 1 л раствора берут: 1,5 г метола, 10 г гидрохинона, 44 г Na_2CO_3 , 104 г Na_2SO_3 , 1,5 г KBg .

Порядок растворения: столовая ложка Na_2SO_3 , метол, гидрохинон, остальной Na_2SO_3 , Na_2CO_3 , KBg .

Проявитель для бумаги. На 1 л раствора берут: 1 г метола, 9 г гидрохинона, 50 г Na_2SO_3 , 25 г Na_2CO_3 , 3 г KBg . Порядок растворения тот, в котором перечислены реактивы.

Фиксаж. 250 г гипосульфита доводят водой до 1 л.

Проявитель для пленки РФ. Время проявления 6—10 мин. На 1 л раствора: 2 г метола, 52 г Na_2SO_3 , 10 г гидрохинона, 40 г Na_2CO_3 , 4 г KBg .

Фиксаж для пленки РФ. I. На 1 л раствора: 250 г гипосульфита, 55 г Na_2SO_3 , 3,5 мл H_2SO_4 ($d = 1,84$). II. На 1 л раствора: 260 г гипосульфита, 50 г NH_4Cl , 17 г метабисульфита натрия. В коробке с пленкой РФ вложен рецепт, какого типа фиксаж необходим.

Оформление выполненных задач практикума

Оформление каждой выполненной задачи напоминает по порядку расположения разделов экспериментальную статью по физиологии. После названия задачи дают краткое теоретическое введение. В отличие от статьи здесь приводят

определение тех понятий, свойств объекта или категорий, которые будут исследоваться в задаче. Кратко, на современном уровне излагают состояние проблемы или вопроса, поставленных в задаче. В конце теоретического введения формулируют цель работы. Во 2-м разделе «Методика» описывают приготовление препарата, если оно встречается в первый раз; рисуют структурную схему установки, приводят параметры раздражения и усиления, необходимые в этой работе; дают перечень растворов и концентрации веществ, использованных в опытах. Обычно в этом же разделе описывают ход опыта. 3-й и 4-й разделы «Полученные результаты» и «Обсуждение результатов» в большинстве случаев строго не разделяют. И для пишущего и для читающего удобнее, если приведенный результат тут же обсуждается. В этих разделах приводят кривые, таблицы полученных в работе данных, графики и диаграммы, построенные на основании экспериментального материала. Проводят статистическую обработку данных, доказывая достоверность полученных результатов. Объясняют основные полученные феномены и интересные отклонения, замеченные во время опыта. Обращают внимание на возможности использовавшихся методов, критически разбирая пределы их использования. Последний раздел протоколов опытов — «Выводы». Они должны быть конкретными и содержать основной цифровой материал, полученный при обработке экспериментальных данных. В 1-м выводе обязательно указывают, что и каким методом измеряли в эксперименте. *Оформление выполненных на практикуме задач — такая же важная часть работы, как и постановка эксперимента.*

ЭЛЕКТРОННЫЕ ПРИБОРЫ В ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ

Изучение функций организма, его систем, органов, тканей и клеток на современном уровне развития физиологии связано с широким практическим применением электронной техники разнообразного назначения. В последние годы разработаны новые, отличающиеся высокой точностью методы объективной регистрации физиологических функций, что в значительной мере расширило возможности их экспериментального изучения на разных уровнях организации — от клеточного до целого организма.

В наши дни все больше различной электронной аппаратуры переходит из научной лаборатории в учебную, так как подготовка современных специалистов невозможна без освоения экспериментальных методов исследования в физиологии. Среди используемой аппаратуры много специальных приборов, предназначенных для воздействия на биологические объекты, а также для получения информации об их функциональном состоянии и изменениях, вызванных тем или иным воздействием. В основе получения такой информации в большинстве случаев лежат радиоизмерения.

Современному физиологу необходимо знать теоретические основы радиоэлектроники, иметь практические навыки работы с современной электронной техникой. Он должен иметь представление о принципах работы и устройстве основных типов электронных приборов, важнейших их характеристик, правилах выбора рабочего режима и техники безопасности работы с аппаратурой, должен освоить методы получения, обработки и оценки экспериментальных данных.

Радиоизмерения в конечном счете сводятся к измерению токов, напряжений, сдвига фаз и т. д. Исследование различных функций организма сопряжено с изучением динамики изменений этих параметров.

Нужно подчеркнуть, что одной из важнейших особенностей радиоизмерений в физиологии является необходимость измерений большого числа величин и параметров, зависящих от многочисленных внешних факторов, точность таких измерений в значительной степени определяется и квалификацией экспериментатора, и состоянием используемого прибора.

Любой измерительный прибор в зависимости от своего назначения, области применения и рода измеряемой величины должен иметь определенные характеристики, обеспечивающие получение возможно более точных результатов измерения. Правильный выбор таких ха-

рактик — одна из задач экспериментатора при постановке исследований.

Предлагаемый раздел практикума посвящен изучению принципов работы и основных характеристик электронных приборов, входящих в состав электрофизиологических экспериментальных комплексов.

В начале раздела кратко изложены основные сведения электротехники и электроники. Этот материал тесно связан с теоретическими введениями задач и поэтому рекомендуется в качестве вспомогательного при подготовке к практикуму. В следующей части, вводной, приведены общие понятия, связанные с применением электронных приборов в электрофизиологических задачах практикума, подчеркивается специфичность изучаемых биоэлектрических сигналов, даны приближенные методы оценки искажений, которым подвергаются эти сигналы в процессе их регистрации. Далее следуют задачи, разбитые по темам.

ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОТЕХНИКИ И ЭЛЕКТРОНИКИ

ПОСТОЯННЫЙ ТОК

Закон Ома. В одноконтурной цепи ток равен отношению алгебраической суммы электродвижущих сил (э. д. с.), E , к арифметической сумме сопротивлений R : $I = \sum E / \sum R$.

Например, для цепи (рис. 1, А) $I = (E_1 - E_2) / (R_1 + R_2)$, причем э. д. с. считается положительной, если ток внутри источника направлен от минусового зажима к плюсовому. При обратном направлении тока э. д. с. отрицательна. Если после вычисления значение тока оказывается отрицательным, значит направление тока противоположно выбранному.

Для отдельной ветви, содержащей источники э. д. с. и сопротивления (например, для ветви ab , рис. 1, Б), $I = (\varphi_a - \varphi_b) + (E_1 - E_2) / (R_1 + R_2) = (U_{ab} + \sum E) / \sum R$, где φ_a и φ_b — потенциалы точек a и b , $U_{ab} = \varphi_a - \varphi_b$.

Законы Кирхгофа. Если электрическая цепь состоит из многих источников э. д. с. и сопротивлений, соединенных так, что имеются точки разветвления тока, то для нахождения токов и напряжений в цепи применяют законы Кирхгофа.

Первый закон. Алгебраическая сумма токов в узле равна нулю: $\sum I = 0$. Составляют $(n - 1)$ уравнений, где n — число узлов.

Токи, приходящие в узел, считаются положительными, выходящие — отрицательными.

Второй закон. Алгебраическая сумма э. д. с. в замкнутом контуре равна алгебраической сумме падений напряжений на сопротивлениях этого контура: $\sum E = \sum IR$. Можно составить $(m - n + 1)$ уравнений, где m — число ветвей в электрической цепи.

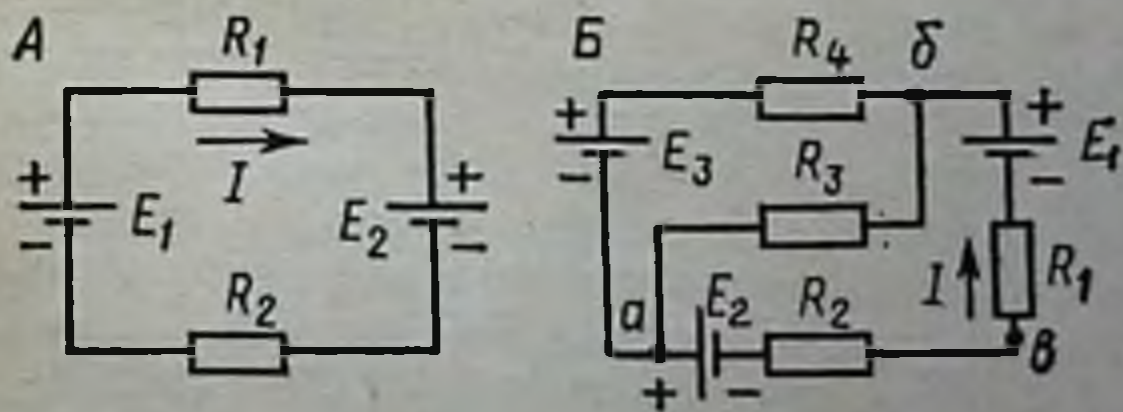


Рис. 1. К закону Ома для цепей разного вида

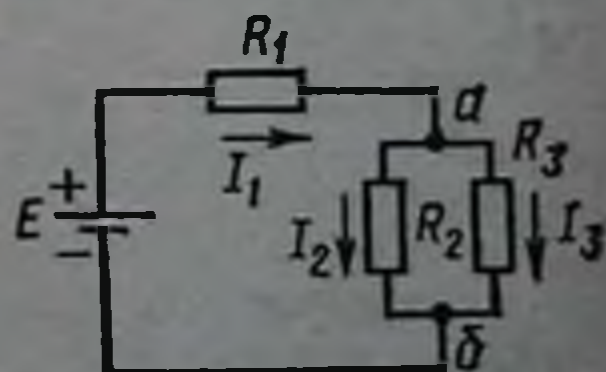


Рис. 2. К законам Кирхгофа

Например, для цепи (рис. 2) $I_1 - I_2 - I_3 = 0$ (для узла а); $I_1 R_1 + I_2 R_2 = E$ и $I_2 R_2 - I_3 R_3 = 0$.

Пример. Составить систему уравнений для определения токов в двухконтурной цепи (рис. 3). Используя законы Кирхгофа, получим: для узла а $I_1 + I_2 - I_3 = 0$; $E_1 = I_1(R_1 + R_4) + I_3 R_3$ для 1-го контура и $E_2 = I_2(R_2 + R_5) + I_3 R_3$ для 2-го контура. При совместном решении этой системы уравнений могут быть найдены значения токов I_1 , I_2 и I_3 и напряжения на сопротивлениях.

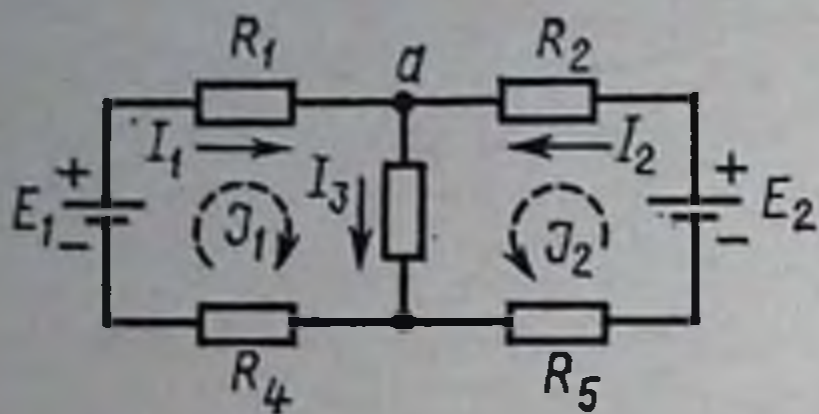


Рис. 3. Двухконтурная электрическая цепь

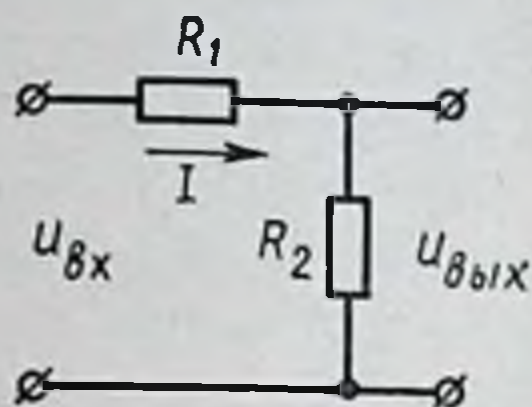


Рис. 4. Делитель напряжения

Пример. Определить напряжение на выходе делительной цепочки (рис. 4).
Решение. $U_{вх} = I(R_1 + R_2)$; $U_{вых} = IR_2 = U_{вх} R_2 / (R_1 + R_2)$;
 $U_{вх} / U_{вых} = (R_1 + R_2) / R_2$.

Полученную простую формулу делителя часто используют на практике. Если нужно произвести деление напряжения в n раз, то делитель рассчитывают, задаваясь величиной одного из сопротивлений R_1 или R_2 . Тогда $R_1 = R_2(n - 1)$ или $R_2 = R_1 / (n - 1)$.

Метод контурных токов. Используя метод контурных токов, расчет сложной цепи можно свести к решению системы из $(m - n + 1)$ уравнений, если ввести в рассмотрение токи, обтекающие каждый контур — *контурные токи* J . В цепи, представленной на рис. 3, направление контурных токов обозначено пунктиром. По 2-му закону Кирхгофа получают: $E_1 = J_1(R_1 + R_3 + R_4) + J_2 R_3$ и $E_2 = J_2(R_2 + R_3 + R_5) + J_1 R_3$. Последние слагаемые учитывают падение напряжения на общем для обоих контуров сопротивлении R_3 при протекании соседних токов. Токи в ветвях электрической цепи определяются как алгебраические суммы контурных токов: $I_1 = J_1$; $I_2 = J_2$; $I_3 = J_1 + J_2$.

Понятие о внутреннем сопротивлении источников э. д. с. При подсоединении к источнику э. д. с. внешнего приемника энергии, например сопротивления $R_{вн}$, во всей цепи потечет ток. Принятое направление тока — от плюсового зажима через $R_{вн}$ к минусу источника, а внутри источника — от минуса к плюсу. При прохождении тока происходит падение напряжения не только на сопротивлении приемника энергии $IR_{вн}$, но и на внутреннем сопротивлении самого источника $IR_{вн}$. Эквивалентная схема источника напряжения может быть представлена в виде последовательно соединенных источника э. д. с. и его внутреннего сопротивления $R_{вн}$. Если, измеряя э. д. с. источника, подключить к нему параллельно прибор (вольтметр, усилитель), то входное сопротивление прибора неизменно окажется включенным последовательно с $R_{вн}$ источника. Это означает, что какая-то часть напряжения, теряемая на $R_{вн}$ источника, не будет измерена.

Биологические источники э. д. с. (мышечная ткань, нервные волокна, клеточные структуры и т. д.) могут иметь очень высокие значения внутренних сопротивлений, которые необходимо учитывать при выборе измерительных устройств. Зачастую в понятие «внутреннее сопротивление» включают совокупность всех сопротивлений, на которых теряется часть измеряемого напряжения. Так, при измерении клеточных э. д. с. применяют микроэлектроды с очень высоким сопротивлением (до $10^8 - 10^9$ Ом), намного превышающим сопротивление самого источника.

Пример. С помощью вольтметра (или измерительного усилителя) с входным сопротивлением $R_{вх} = 100$ кОм измеряют мембранный потенциал клетки с

э. д. с. 70 мВ. Сопротивление микроэлектрода $R_{вн} = 10^7$ Ом. Определить погрешность измерения.

$U = E - IR_{вн}$, но $I = U/R_{вх}$, тогда напряжение на зажимах измерительного прибора будет равно: $U = ER_{вх}(R_{вн} + R_{вх})^{-1} = 70 \cdot 10^3 (10^5 (1 + 100))^{-1} = 0,7$ мВ; $E - U = 69,3$ мВ.

Большая погрешность измерения явилась следствием несоответствия параметра $R_{вх}$ выбранного прибора поставленной задаче. Зависимость U от отношения $R_{вн}/R_{вх}$ определяется формулой $U = E(R_{вн}/R_{вх} + 1)^{-1}$, откуда следует, что чем больше будет отношение $R_{вх}/R_{вн}$, тем более точно будет измерена величина E .

Итак, при измерении напряжений сопротивление входа измерительного устройства должно во много раз превышать значение внутреннего сопротивления измеряемого источника, т. е. $R_{вх} \gg R_{вн}$.

Метод эквивалентного генератора (теорема Тевенена, теорема об активном двухполюснике). Любая электрическая схема с произвольным числом источников э. д. с. и сопротивлений, имеющая два выходных зажима, может быть заменена одним эквивалентным источником э. д. с. $E_{экв}$, равной напряжению на этих зажимах, и с внутренним сопротивлением $R_{экв}$, равным сопротивлению этой схемы между разомкнутыми зажимами a и b при условии, что э. д. с. всех источников энергии принимаются равными нулю. Этот метод удобен, когда надо найти ток только в одной из ветвей сложной электрической цепи.

Пример. С использованием метода эквивалентного генератора найти ток I_3 в ветви (рис. 5, А), содержащей E_3 и R_3 , если известно, что $E_1 = 16$ В, $E_2 = 7$ В, $E_3 = 2$ В, $R_1 = 2$ Ом, $R_2 = 3$ Ом, $R_3 = 4$ Ом. 1. Отключаем ветвь от зажимов ab и находим ток в остальной цепи: $I = (E_1 - E_2)/(R_1 + R_2) = (16 - 7)/(2 + 3) = 1,8$ А. Тогда напряжение на зажимах будет равно: $U_{ab} = E_1 - IR_1 = 16 - (1,8 \cdot 2) = 12,4$ В. Напряжение эквивалентного источника э. д. с. $E_{экв} = U_{ab}$. 2. Внутреннее сопротивление этого источника найдем, приравняв нулю E_1 и E_2 , т. е. закоротив оба источника. Сопротивление в точках a, b окажется равным сумме двух параллельно включенных сопротивлений R_1 и R_2 : $R_{экв} = R_1 R_2 / (R_1 + R_2) = 2 \cdot 3 / 5 = 1,2$ Ом. Подсоединив к эквивалентной схеме генератора (рис. 5, Б) ветвь ($E_3 - R_3$), вычислим I_3 : $I_3 = (U_{ab} - E_3)/(R_{экв} + R_3) = (12,4 - 2)/(1,2 + 4) = 2$ А.

Пример. Определить ток I_5 через R_5 мостовой схемы (рис. 6, А), применив метод эквивалентного генератора. 1. Отключив R_5 , определяем потенциалы точек b и z относительно точки a . 2. Разность потенциалов в точках bz (напряжение U_{bz}) равна напряжению эквивалентного источника: $U_{bz} = U_{ab} - U_{az}$, где $U_{ab} = ER_2/(R_1 + R_2)$, а $U_{az} = ER_4/(R_3 + R_4)$. 3. Внутреннее сопротивление этого источника равно сопротивлению на зажимах bz при $E = 0$ (рис. 6, Б);

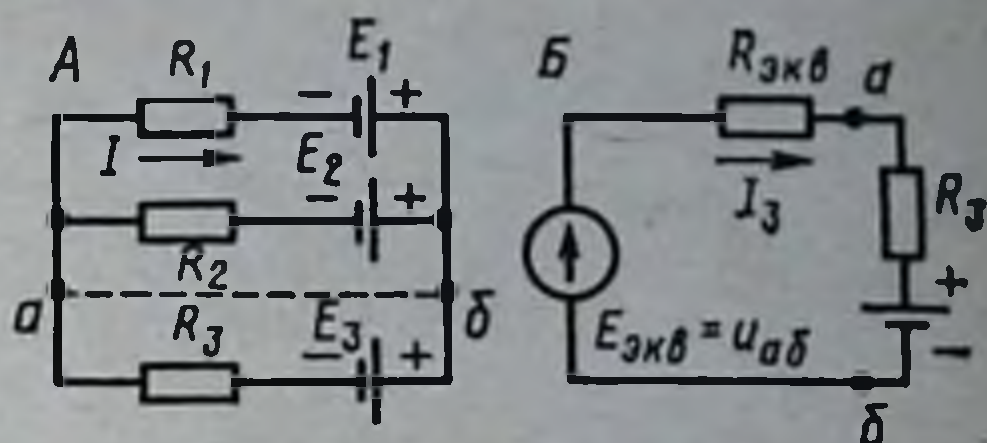


Рис. 5. К решению электрической цепи методом эквивалентного генератора

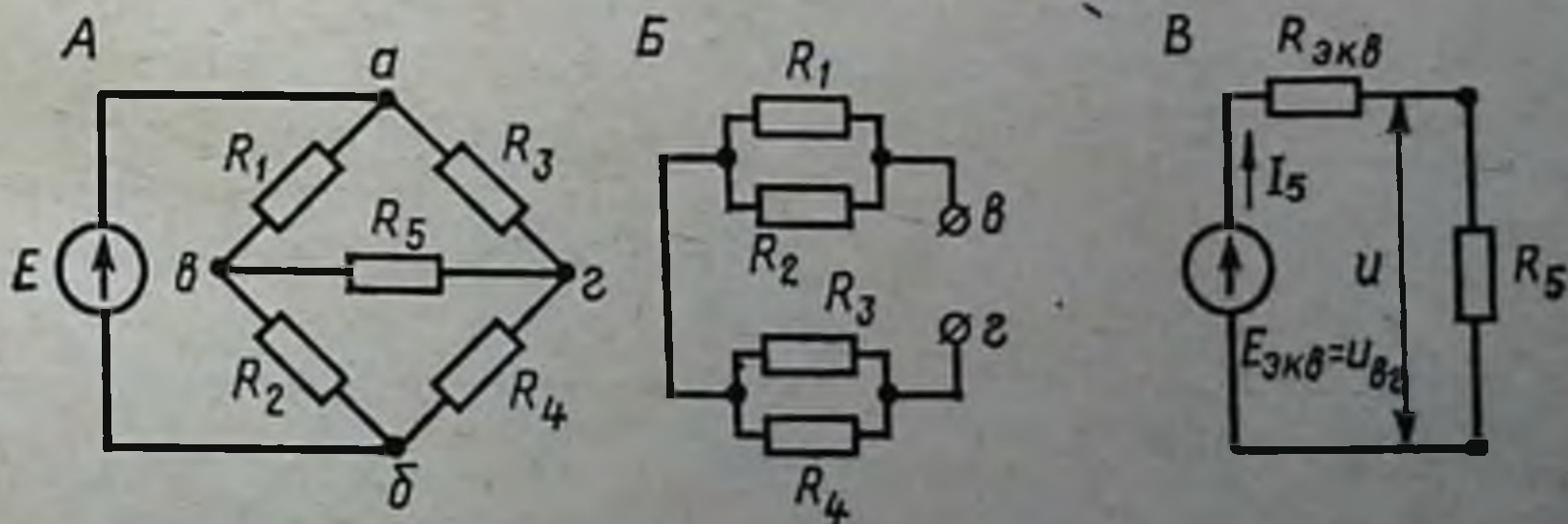


Рис. 6. К решению мостовой схемы методом эквивалентного генератора

$R_{\text{экв}} = R_{\text{экв}} = R_1 R_2 / (R_1 + R_2) + R_3 R_4 / (R_3 + R_4)$. 4. Подсоединив к эквивалентному источнику сопротивление R_5 , определяем I_5 (рис. 6, В): $I_5 = U_{\text{в.}} / (R_{\text{экв}} + R_5)$.

Нелинейные сопротивления. Зависимость тока, проходящего через сопротивление, от напряжения на его зажимах $I = F(U)$ называется *вольтамперной характеристикой*. Для обычных сопротивлений эта зависимость выражена прямой, выходящей из начала координат (рис. 7, А). Существуют элементы, обладающие нелинейной вольтамперной характеристикой (рис. 7, Б). Ток в этих элементах не пропорционален напряжению, что свидетельствует о неприменимости к ним закона Ома. К таким элементам относятся радиолампы, полупроводниковые диоды, транзисторы, лампы накаливания и т. д. Так как сопротивление нелинейного элемента не является постоянной величиной, то для расчета нелинейных цепей вводят понятие *статического* ($R_{\text{ст}}$) и *динамического* ($R_{\text{д}}$) сопротивлений.

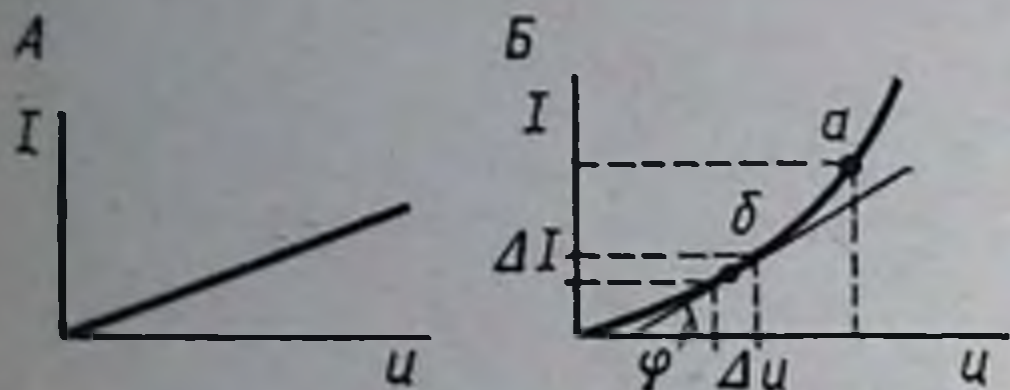


Рис. 7. Вольтамперные характеристики

Статическое сопротивление (например, в точке а) характеризует рабочий режим элемента: $R_{\text{ст}} = U/I$.

Отношение приращения напряжения к приращению тока (в пределе производная напряжения по току) определяет динамическое сопротивление. Оно равно обратному значению тангенса угла между касательной к вольтамперной характеристике (например, в точке б) и осью абсцисс (рис. 7, Б): $R_{\text{д}} = dU/dI = (\text{tg } \alpha)^{-1}$. Для относительно линейного участка характеристики динамическое сопротивление можно определить как отношение малых приращений напряжения и тока.

Определение тока и напряжений в цепи, состоящей из последовательно соединенного линейного и нелинейного сопротивлений. Пусть задана электрическая цепь, состоящая из последовательно включенных: э. д. с., линейного и нелинейного сопротивлений, падение напряжения U_2 на котором неизвестно. Для этой цепи по 2-му закону Кирхгофа $E = IR + U_2$.

Для определения неизвестных I и U_2 требуется еще одно уравнение. Можно воспользоваться аналитическим выражением для вольтамперной характеристики нелинейного элемента $I = F(U_2)$. Однако чаще применяют графический способ расчета таких цепей. При этом используют заданную вольтамперную характеристику нелинейного элемента, а уравнение для тока представляют в следующем виде: $I = E/R - U_2/R$.

Точка пересечения прямой, определяемой этим уравнением, с вольтамперной характеристикой $I = F(U)$ нелинейного элемента (рис. 8) соответствует току в цепи, а отрезки U_1 и U_2 — падениям напряжения на линейном и нелинейном сопротивлениях.

Эта прямая *аб* называется *линией нагрузки*. Для ее построения определяют точки пересечения с осями координат: при $I = 0$, $U_2 = E$ и $U_2 = 0$, $I = E/R$. Такое решение полностью соответствует аналитическому.

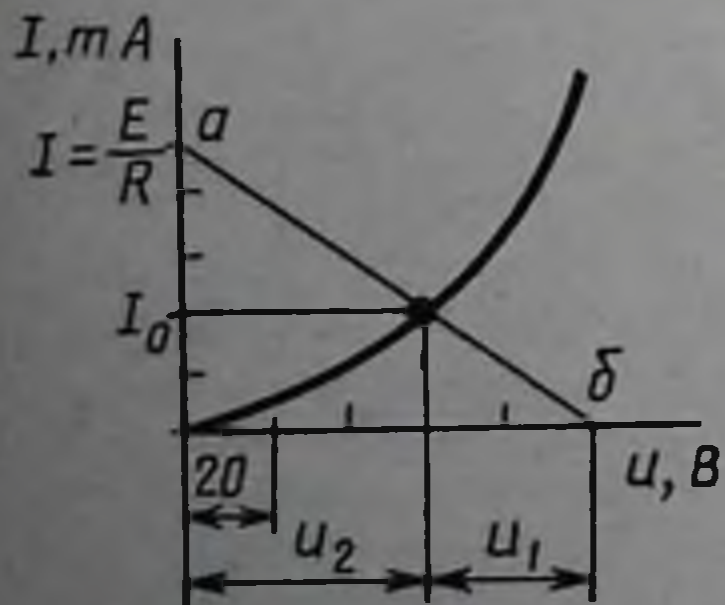


Рис. 8. К графическому расчету токов и напряжений

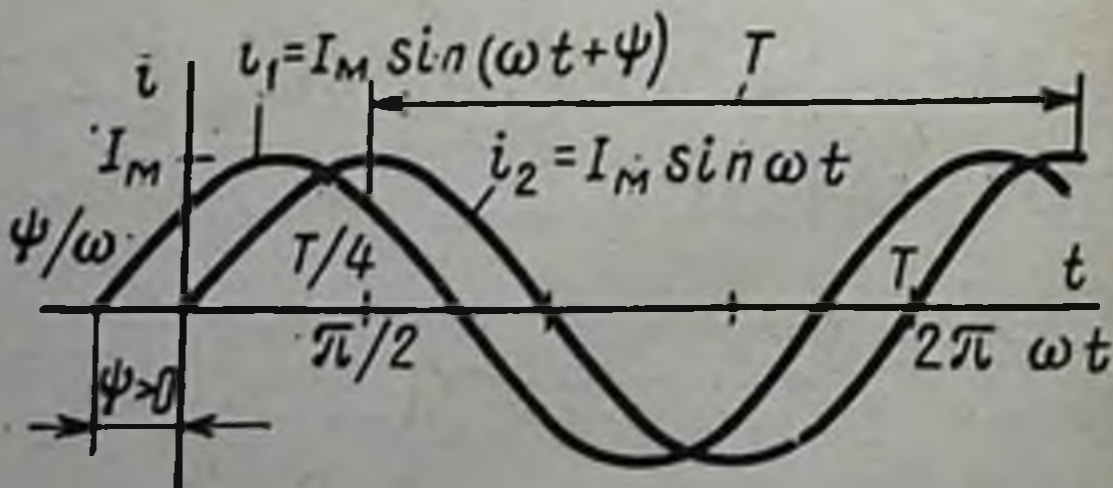


Рис. 9. К расчету сдвига фаз

Пример. Пусть задана цепь, состоящая из последовательно соединенных сопротивлений $R = 20$ кОм и радиолампы (триод) с известной вольтамперной характеристикой (рис. 8). Определяем координаты линии нагрузки: $U = E = 100$ В, $I = E/R = 100/(20 \cdot 10^3) = 5$ мА. Из графика следует: $I_0 = 2$ мА, $U_1 = 40$ В, $U_2 = 60$ В.

ПЕРЕМЕННЫЙ ТОК

Любой, изменяющийся во времени электрический ток называется переменным. Он может меняться или только по величине, или по величине и направлению. Его значение в рассматриваемый момент времени i называется *мгновенным значением* и обозначается i . Разновидностью переменного тока является также *периодический ток*, мгновенные значения которого повторяются через равные промежутки времени. *Периодом переменного тока* T называется наименьший промежуток времени, по истечении которого мгновенные значения периодического тока повторяются. Величина, обратная периоду, называется *частотой переменного тока* f .

Постоянный ток можно рассматривать как частный случай периодического тока с периодом $T = \infty$ и $f = 0$. Переменными могут быть также напряжение, э. д. с. и другие электрические и магнитные величины, изменяющиеся во времени.

Особое место среди периодических переменных токов занимает гармонический ток. Его мгновенное значение определяется выражением

$$i = I_M \sin [(2\pi/T)t + \psi],$$

где I_M — максимальное значение, или амплитуда тока (рис. 9).

Аргумент синуса $[(2\pi/T)t + \psi]$ определяет фазу гармонического изменения тока и называется *фазовым углом* или *фазой*. Величина ψ представляет значение фазового угла в начальный момент времени ($t = 0$) и называется *начальным фазовым углом* или *начальной фазой*.

Величина $2\pi/T$, измеряющая скорость изменения фазового угла, называется *угловой частотой* и обозначается ω . $\omega = 2\pi/T = 2\pi f$ и измеряется числом радианов, на которое увеличивается фазовый угол в секунду. Так, при $f = 50$ Гц $\omega = 2\pi f = 6,28 \cdot 50 = 314$ рад/с.

Гармоническая функция является элементарной, т. е. не является суммой каких-либо составляющих. Прохождение синусоидальных токов через цепи, содержащие линейные элементы, т. е. элементы, параметры которых R , L и C не зависят от тока и напряжения, хорошо изучено. Например, в случае синусоидальной э. д. с., действующей на входе линейной цепи, напряжения и токи на отдельных ее участках изменяются по одному и тому же синусоидальному закону.

Гармоническая функция обладает еще рядом замечательных свойств, подтверждающих ее элементарный характер. Например, сумма синусоид одного и того же периода есть синусоида того же периода. Производная гармонической функции также является гармонической функцией того же периода, опережающей на $T/4$ данную. Интеграл от гармонической функции есть гармоническая функция того же периода, отстающая на $T/4$ от данной.

Этими свойствами не обладают электрические сигналы несинусоидальной формы. Например, в случае негармонической э. д. с., действующей на входе линейной электрической цепи, напряжения и токи на ее отдельных участках будут изменяться не по одному закону, т. е. будут иметь разную форму.

Негармонические электрические процессы в отличие от гармонических являются сложными и могут быть представлены суммой гармонических составляющих. Искажения, которым подвергаются электрические сигналы несинусоидальной формы (например, импульсы биоэлектрической активности) при прохождении через линейные цепи, будут эквивалентны искажениям какого-то определенного спектра частот синусоидальных сигналов при их прохождении через эти цепи.

Емкость в цепи переменного тока. Сопротивление емкости. Как известно, заряд q идеального конденсатора пропорционален напряжению, приложенному

к его электродам, $q = CU_C$, а изменение заряда пропорционально изменению напряжения; $dq = CdU_C$, но $i = dq/dt$ и, следовательно, $i = CdU_C/dt$.

Ток в цепи с емкостью пропорционален не напряжению, как в цепях с обычными активными сопротивлениями, а скорости изменения напряжения. Например, если напряжение в цепи с емкостью меняется по закону $U = F(t)$ (рис. 10, А), то ток в интервале $t_2 - t_3$ будет равен нулю, так как $dU/dt = 0$,

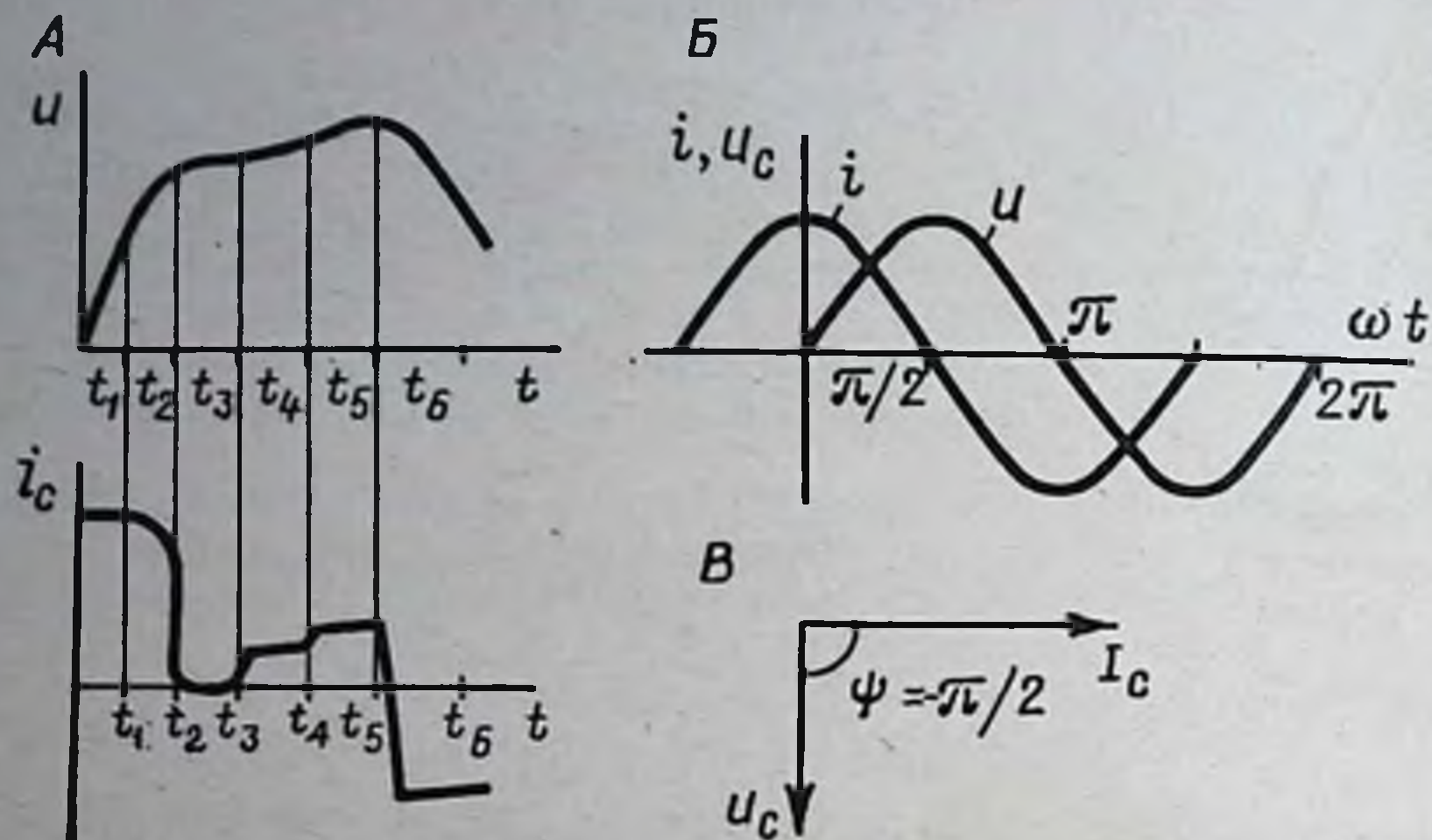


Рис. 10. К анализу действия переменного тока в цепях с емкостью

а в интервале $t_1 - t_2$, где действуют меньшие значения напряжения, ток будет больше нуля: $dU/dt > 0$; в интервале $t_5 - t_6$ $i_C < 0$, так как $dU/dt < 0$. С увеличением частоты гармонического напряжения, что равносильно уменьшению периода, сопротивление емкости переменному току уменьшается. В случае, когда $f = 0$ (при постоянном напряжении), $dU/dt = 0$ — сопротивление емкости постоянному току бесконечно велико.

Пусть на идеальную емкость подано синусоидальное напряжение (рис. 10, Б) $U_C = U_M \sin \omega t$, где U_M — амплитуда. Ток при этом будет равен: $i = C dU_C/dt = Cd(U_M \sin \omega t)/dt = \omega C U_M \cos \omega t = I_M \sin(\omega t + \pi/2)$, т. е. ток и напряжение в цепи с конденсатором без утечки сдвинуты друг относительно друга по фазе на $\pi/2$ (рис. 10, Б). Для амплитудных значений $I_M = \omega C U_M = U_M : (1/\omega C)$.

Действующие значения напряжения и тока также связаны соотношением $U = (1/\omega C)I$. Векторная диаграмма для этого случая приведена на рис. 10 В. (На векторных диаграммах угол сдвига фаз откладывают от вектора тока к вектору напряжения. Угол, откладываемый против часовой стрелки, считается положительным, а по часовой — отрицательным.)

Величина $1/\omega C$, имеющая размерность сопротивления, называется *емкостным сопротивлением*, обозначается χ_C , оно обратно пропорционально частоте.

Индуктивность L в цепи переменного тока. Изменение тока в индуктивности вызывает появление э. д. с. индукции e_L , которая по закону Ленца препятствует изменению тока: $e_L = -L di/dt$.

Условием прохождения переменного тока $i = I_M \sin \omega t$ через индуктивность является подача на зажимы напряжения U , равного и противоположного наведенной э. д. с.: $U = -e_L = L di/dt = \omega L I_M \cos \omega t = \omega L I_M \sin(\omega t + \pi/2) = U_M \sin(\omega t + \pi/2)$, где $U_M = \omega L I_M$, I_M — амплитуда тока.

Напряжение в цепи с идеальной индуктивностью опережает ток на $\pi/2$.

Величина $\chi_L = \omega L = 2\pi f L$, имеющая размерность сопротивления, называется *индуктивным сопротивлением*, оно линейно зависит от частоты.

Если ко входу схемы, представляющей собой последовательно соединенные сопротивление, индуктивность и емкость (рис. 11, А), подано синусоидальное

напряжение, то действующее значение этого напряжения будет выражаться геометрической суммой векторных величин падений напряжений на активном сопротивлении R , на индуктивном сопротивлении $\chi_L = \omega L$ и емкостном — $\chi_C = 1/\omega C$. Напряжение U_R совпадает по направлению с током, U_C отстает от тока на $\pi/2$, а U_L опережает ток на $\pi/2$.

Из векторной диаграммы (рис. 11, Б)

$$U = \sqrt{U_R^2 + (U_L - U_C)^2} = I \sqrt{R^2 + (\chi_L - \chi_C)^2} = IZ,$$

где $Z = \sqrt{R^2 + (\chi_L - \chi_C)^2}$ — полное сопротивление электрической цепи

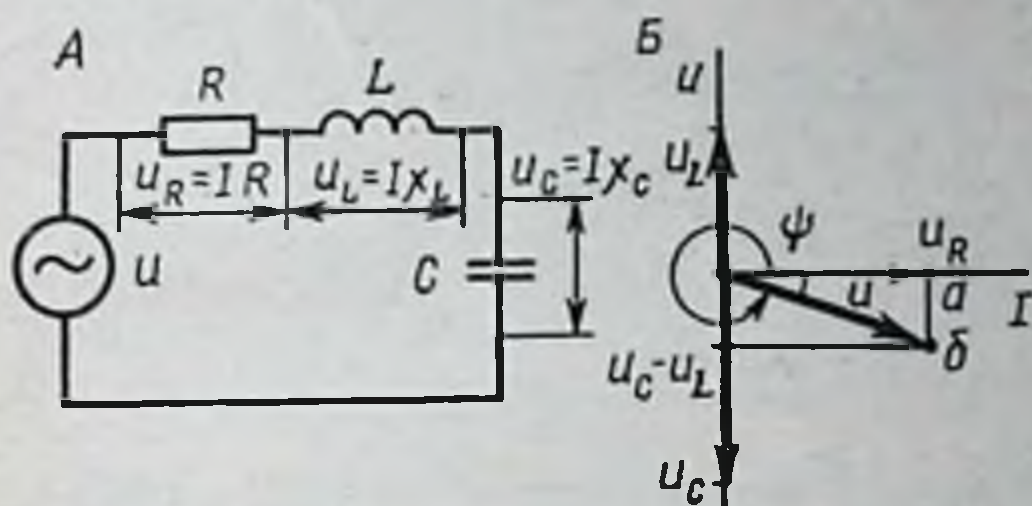


Рис. 11. Цепь LCR (А) и векторная диаграмма токов и напряжений (Б)

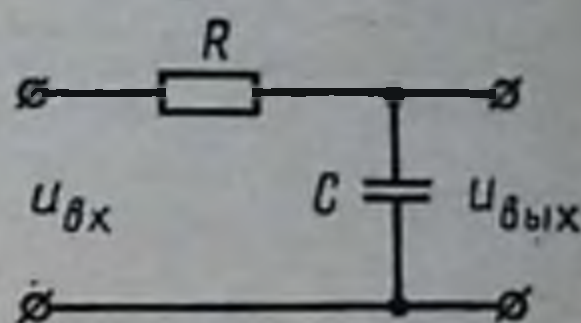


Рис. 12. RC-цепь

или $I = U / \sqrt{R^2 + (\chi_L - \chi_C)^2}$ — закон Ома неразветвленной цепи переменного тока.

В общем случае, когда $U_L \neq U_C$, ток сдвинут по фазе относительно напряжения на угол ψ : $\psi = \arctg (U_L - U_C)/U_R = \arctg(\omega L - 1/\omega C)/R = \arctg (\chi_L - \chi_C)/R$. В случае, когда $(\omega L - 1/\omega C) > 0$, преобладает индуктивное сопротивление, и ток будет отставать от напряжения на угол ψ .

В случае $(\omega L - 1/\omega C) < 0$ в цепи преобладает емкостное сопротивление, и ток опережает напряжение, приложенное к цепи. При $\omega L = 1/\omega C$ реактивное сопротивление равно нулю, а полное сопротивление Z равно R , т. е. имеет минимальное значение (резонанс напряжений).

Пример. Пусть мгновенные значения напряжения и тока заданы выражениями: $U = 100 \sin(157t + \pi/10)$ В, $i = 5 \sin(157t - \pi/8)$ А. Определить: а) период и частоту напряжения и тока; б) сдвиг фаз между напряжением и током; в) времена, соответствующие начальным фазам напряжения и тока.

Решение. а) Период и частота равны: $T = 2\pi/\omega = 6,28/157 = 0,04$ с; $f = 1/T = 1/0,04 = 25$ Гц; б) ток по фазе отстает от напряжения на угол: $\psi = \pi/10 - (-\pi/8) = 9\pi/40$ рад = $40^\circ 30'$; в) времена, соответствующие начальным фазам напряжения t' и тока t'' соответственно равны:

$$|t'| = (\pi/10) : \omega = 2\pi/20\omega = T/20 = 0,04/20 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ с}; \quad t'' = (\pi/8) : \omega = (1/16)(2\pi/\omega) = T/16 = 0,04/16 = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ с}.$$

Пример. Определить амплитуды напряжений на выходе цепи (рис. 12) для случаев, когда частота $U_{вх}$ равна 1000 Гц и 10 кГц, амплитуда входного напряжения $U_M = 1,4$ В, $R = 10$ кОм, $C = 0,015$ мФ.

Решение. Емкостное сопротивление χ_C для $f = 1000$ Гц:

$$\chi_{C1} = \frac{1}{2\pi f C} = \frac{1}{6,28 \cdot 10^3 \cdot 0,015 \cdot 10^{-6}} = 10^4 \text{ Ом} = 10 \text{ кОм}; \text{ для } f = 10 \text{ кГц:}$$

$$\chi_{C2} = \frac{1}{6,28 \cdot 10^4 \cdot 0,015 \cdot 10^{-6}} = 10^3 \text{ Ом} = 1 \text{ кОм}.$$

Полные сопротивления цепи: $Z_1 = \sqrt{R^2 + \chi_{C_1}^2} = \sqrt{10^3 + 10^3} \approx 14 \text{ кОм};$

$$Z_2 = \sqrt{R^2 + \chi_{C_2}^2} = \sqrt{10^3 + 1^2} \approx 10 \text{ кОм}.$$

Токи в цепи для первого и второго случаев будут равны: $I_1 = U_M/Z_1 = 1,4/(14 \cdot 10^3) = 10^{-4} \text{ А} = 0,1 \text{ мА};$ $I_2 = U_M/Z_2 = 1,4/10^4 = 0,14 \cdot 10^{-3} \text{ А} = 0,14 \text{ мА}.$

Значения напряжений на выходе:

$$U_{\text{вых}_1} = I_1 \chi_{C_1} = 10^{-4} \cdot 10^4 = 1 \text{ В}; \quad U_{\text{вых}_2} = I_2 \chi_{C_2} = 0,14 \cdot 10^{-3} \cdot 10^3 = 0,14 \text{ В}.$$

ПЕРЕХОДНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ RC-ЦЕПЯХ

Если ко входу цепи, состоящей из активных сопротивлений, подать постоянное напряжение, то на выходе этой цепи напряжение установится практически мгновенно. При размыкании ключа $U_{\text{вых}}$ также практически мгновенно упадет до нуля. Такой процесс перехода от одного установившегося значения напряжения к другому в цепях, содержащих емкость (рис. 13, А), будет происходить иначе.

Значение тока в RC-цепи в произвольный момент времени определяется по закону Ома: $i = (U_0 - U_C)/R$. Так как в момент t_1 (рис. 13, Б) заряд конденсатора еще равен нулю и $U_C = 0$, то ток в цепи будет максимальным, т. е. $i = U_0/R$. С течением времени по мере заряда конденсатора, когда $U_C \rightarrow U_0$, ток будет уменьшаться, стремясь к нулю. В момент t_2 , когда внешнее напряжение равно нулю, а конденсатор заряжен до напряжения U_0 , последует разряд емкости через R и внутреннее сопротивление генератора. В результате ток в цепи потечет в обратном направлении и U_C будет уменьшаться, стремясь к нулю.

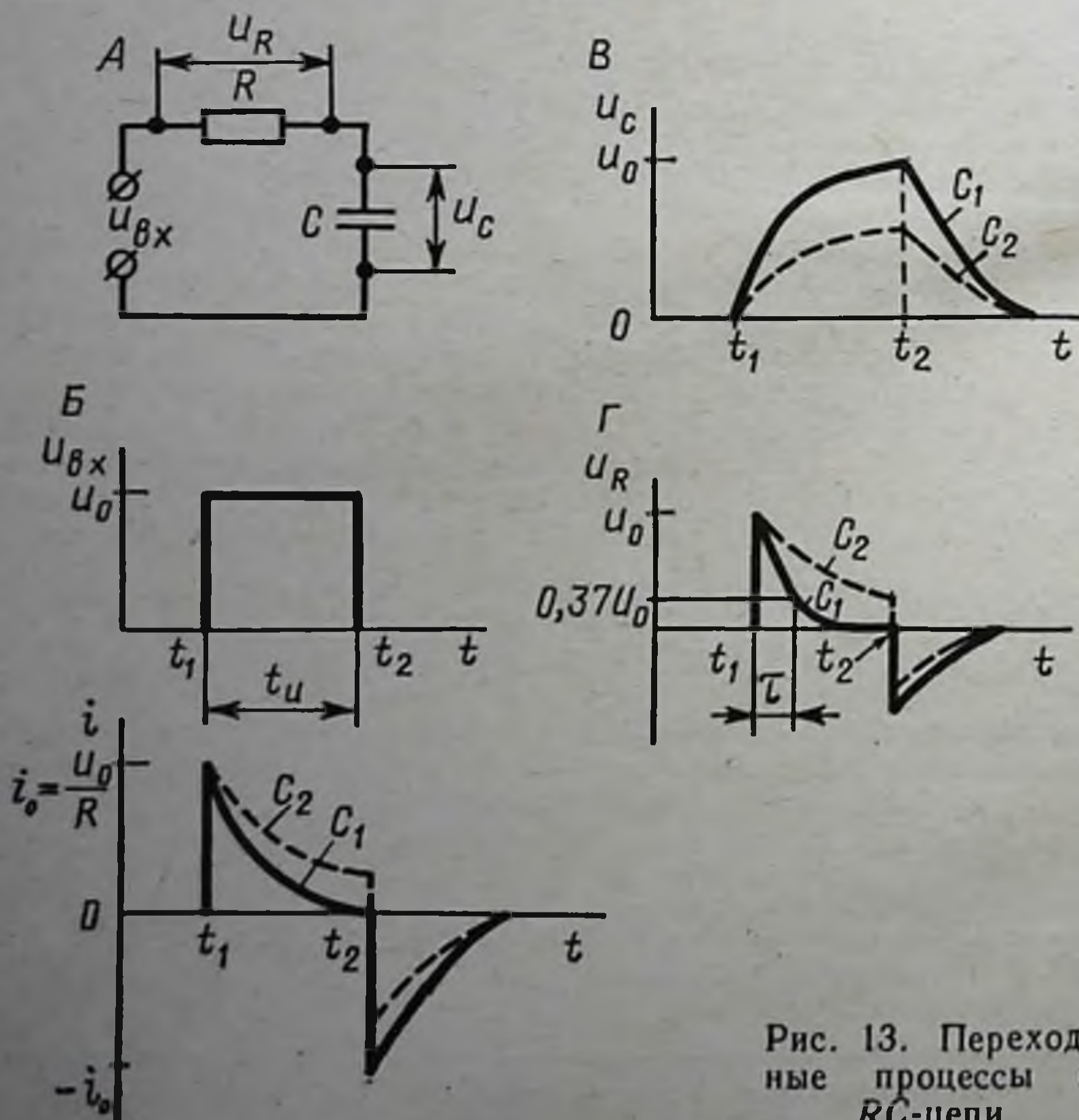


Рис. 13. Переходные процессы в RC-цепи

Изменение падения напряжения на сопротивлении $U_R = iR$ будет происходить по закону изменения тока.

Часто пренебрегают внутренним сопротивлением генератора, считая его значительно меньшим сопротивления R , и тогда $U_0 \approx U_{вх}$.

Заряд и разряд емкости происходит по экспоненциальному закону: $i = (U_0 - U_C)/R$, но $i = C(dU_C/dt)$ и, следовательно, $RC(dU_C/dt) = U_0 - U_C$. Или, так как $dU_C = -d(U_0 - U_C)$, $d(U_0 - U_C)/(U_0 - U_C) = -(1/RC)dt$;

$\int \frac{d(U_0 - U_C)}{U_0 - U_C} = -\frac{1}{RC} \int dt$; $\ln(U_0 - U_C) = (t/RC) + \ln A$, где $\ln A$ — постоянная интегрирования. Таким образом, $\ln[(U_0 - U_C)/A] = -(t/RC)$ и $U_C = U_0 - Ae^{-t/RC}$.

Постоянная A определяется из начальных условий: при $t = t_1$ $U_C = 0$ и, следовательно, $A = U_0$. Тогда $U_C = U_0(1 - e^{-t/RC})$.

Произведение $\tau = RC$ называется *постоянной времени* RC -цепи. τ выражается в секундах, R — в омах, C — в фарадах. Если в RC -цепи в качестве выхода использовать емкость (такую цепь называют *интегрирующей*), то с момента появления импульса на входе напряжение $U_{вых}$ будет возрастать по экспоненциальному закону: $U_{вых} = U_C = U_0(1 - e^{-t/\tau})$.

Искажения формы импульсов в этом случае будут тем больше, чем больше RC (рис. 13, В), что объясняется увеличением времени заряда — разряда емкости. Уменьшение длительности импульса при $\tau = \text{const}$ также приводит к увеличению искажений. Искажения формы импульсов в интегрирующей цепочке тем меньше, чем больше отношение длительности импульса $t_{и}$ к постоянной времени цепи τ . При $t = \tau$ напряжение на емкости RC -цепи достигнет уровня: $U_{вых} = U_0(1 - e^{-1}) \approx 0,63 U_0$, т. е. 63% от амплитуды импульса. Это свойство часто используют в практических измерениях, в частности в электрофизиологии при измерении постоянной времени мембран живых клеток.

Если в RC -цепи в качестве выходного напряжения использовать U_R , то $U_{вых}$ будет экспоненциально убывать по закону $U_{вых} = U_R = U_0 e^{-t/\tau}$.

Искажения формы импульсов в этом случае будут тем меньше, чем больше τ . Это объясняется замедлением процесса заряда — разряда емкости и, следовательно, уменьшением во времени спада U_R . Можно показать, что изменение длительности импульса при $\tau = \text{const}$ также приводит к изменению искажений.

Таким образом, RC -цепь в зависимости от τ и способа снятия $U_{вых}$ будет дифференцирующей ($U_{вых} = U_R$; $\tau \ll t_{и}$), переходной ($U_{вых} = U_R$; $\tau \gg t_{и}$) или интегрирующей ($U_{вых} = U_C$; $\tau \gg t_{и}$). При $t = \tau$ напряжение U_R достигнет уровня $U_R = U_0 R^{-1} \approx 0,37 U_0$, т. е. упадет до 37% от максимального значения (рис. 13, Г).

Частотные характеристики RC -цепей. Частотной характеристикой называется зависимость напряжения на выходе цепи от частоты $U_{вых} = F(f)$ при неизменном напряжении на входе.

В интегрирующей цепи (рис. 14, А) при $f \rightarrow 0$ $\chi_C \rightarrow \infty$ и, следовательно, $U_{вых} \rightarrow U_{вх}$. С увеличением частоты сопротивление χ_C уменьшается, что приводит к увеличению тока в цепи и, следовательно, к увеличению падения напряжения на сопротивлении R . В результате $U_{вых}$ уменьшается (рис. 14, Б). Ход частотной характеристики меняется при изменении τ . Если $\tau_2 > \tau_1$, напри-

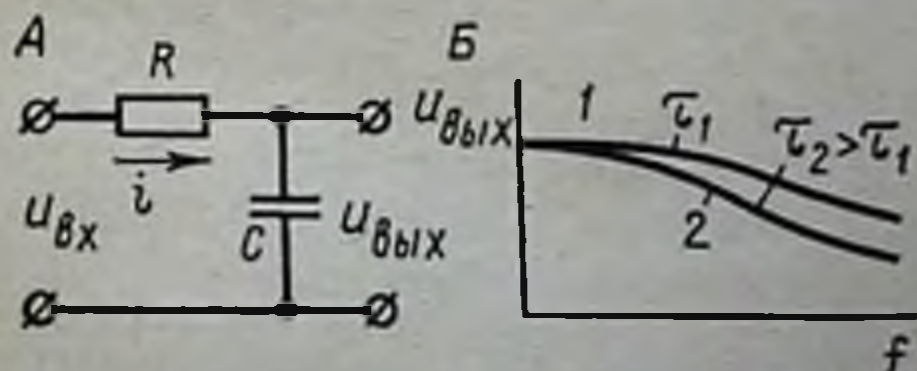


Рис. 14. Интегрирующая RC -цепь (А) и ее частотная характеристика (Б)

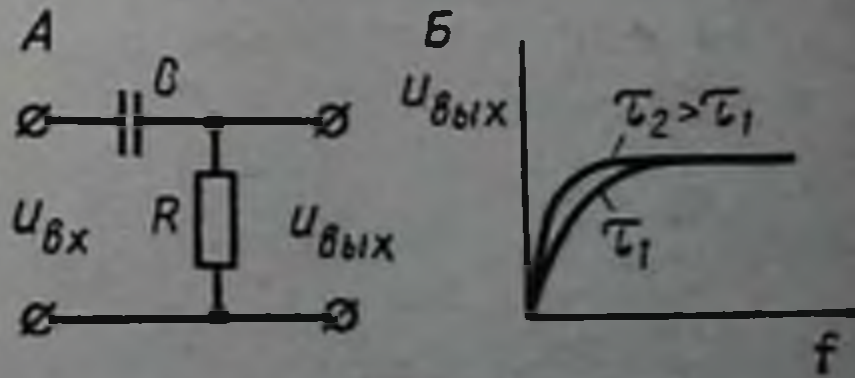


Рис. 15. Дифференцирующая RC -цепь (А) и ее частотная характеристика (Б)

мер, при $C_2 > C_1$, то при тех же значениях частот, что и в первом случае, $U_{\text{вых}}$ будет иметь меньшие значения (так как $\chi_{C_2} < \chi_{C_1}$) и вторая характеристика пройдет ниже первой.

В дифференцирующей цепи (рис. 15, А) при $f \rightarrow 0$ $\chi_C \rightarrow \infty$ и $U_{\text{вых}} = 0$.

С увеличением частоты сопротивление емкости χ_C уменьшается и $U_{\text{вых}}$ увеличивается. При некоторых частотах χ_C достигает столь малых значений, что его дальнейшее уменьшение практически не влияет на выходное напряжение (рис. 15, Б). При изменении τ меняется ход частотной характеристики. Если $\tau_2 > \tau_1$, например, при $C_2 > C_1$, то $U_{\text{вых}}$ будет иметь большие значения ($\chi_{C_2} < \chi_{C_1}$), и вторая характеристика пройдет выше первой.

Частотные искажения электрических сигналов в RC -цепях обусловлены неравномерностью их частотных характеристик в области низких и высоких частот. В случае подачи на вход RC -цепи гармонического напряжения эти искажения имеют линейный характер, т. е. меняется только амплитуда сигнала, а его форма остается неискаженной. При прохождении через интегрирующую RC -цепь прямоугольного импульса искажениям подвергаются его быстрые компоненты (передний и задний фронты). Медленная же компонента (вершина) прямоугольного импульса подвергается искажениям при прохождении через дифференцирующую RC -цепь. Такая связь между искажениями прямоугольного импульса и частотными характеристиками RC -цепей объясняется тем, что напряжения несинусоидальной формы являются сложными электрическими колебаниями и могут быть представлены суммой гармонических составляющих.

Для неискаженной передачи всех компонентов сложного сигнала, в частности прямоугольного импульса, необходимо, чтобы RC -цепи обладали частотными характеристиками, имеющими достаточную равномерность в пределах спектра частот этого сигнала.

ЭЛЕКТРОННЫЕ ЛАМПЫ

Наиболее простым типом электровакуумного прибора является двухэлектродная лампа — диод (рис. 16, А). Диод состоит из стеклянного баллона, в котором помещены металлический анод (цилиндрический или плоский) и катод, представляющий собой никелевую трубочку, покрытую материалом с высокой эмиттирующей способностью. Роль подогревателя катода выполняет вольфрамовая накальная нить, на которую подается небольшое напряжение (подогрев катода — единственная функция нити накала, поэтому, как правило, на принципиальных схемах ее не изображают).

Эмиттируемые катодом электроны под действием положительного (относительно катода) напряжения на аноде направляются в сторону анода. Таким образом, через лампу потечет *анодный ток* в направлении от анода к катоду (техническое направление тока принято считать обратным направлению движения электронов). Зависимость анодного тока от напряжения на аноде $I_a = F(U_a)$, т. е. вольтамперная характеристика диода имеет вид, изображенный на рис. 16, Б. Нелинейность характеристики обусловлена характером изменения электронного потока при изменении анодного напряжения. Этот вопрос по-

дробно рассмотрен в специальной литературе. При обратной полярности напряжения на участке анод—катод эмиттированные электроны будут стремиться вернуться на катод и ток через лампу проходить не будет. Характерное свойство диода — *односторонняя проводимость* — используется в основном для выпрямления переменного тока.

В 3-электродной лампе, *триоде* (рис. 17, А), третий электрод

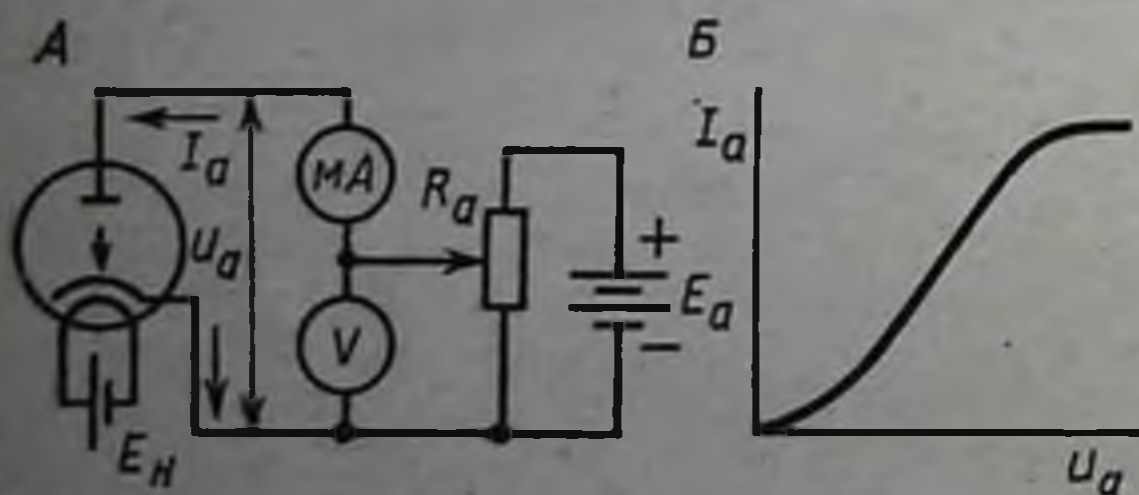


Рис. 16. Диод (А) и его вольтамперная характеристика (Б)

помещен между катодом и анодом. Этот электрод, называемый сеткой, выполнен в виде проволочной спирали, окружающей катод. Электрическое поле сетки, если на нее подан некоторый потенциал относительно катода, гораздо эффективнее, чем поле анода влияет на электронный поток, так как сетка расположена ближе к катоду. Сетка в триоде является управляющим электродом, изменением потенциала которого можно менять величину анодного тока в широких пределах. Семейство вольт-

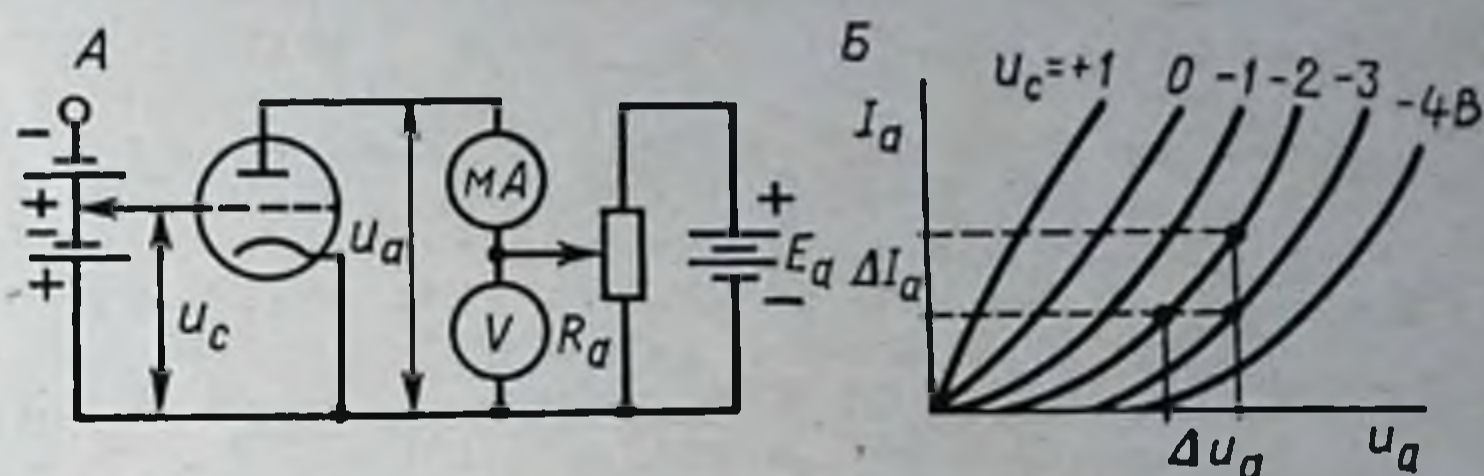


Рис. 17. Триод (А) и семейство его анодных характеристик (Б)

амперных характеристик триода $I_a = F(U_a)$, полученных при разных, но постоянных для каждой характеристики напряжениях на сетке, представлено на рис. 17, Б.

Степень воздействия сеточного напряжения на величину анодного тока S определяется отношением изменения анодного тока ΔI_a к вызвавшему это изменение напряжению ΔU_c на сетке при постоянном напряжении на аноде:

$$S = \left| \Delta I_a / \Delta U_c \right|_{U_a = \text{const}} \text{ (mA/V)}.$$

Эта величина, являющаяся коэффициентом усиления лампы по току, называется *крутизной характеристики триода*.

Приращение анодного тока на ту же величину ΔI_a можно получить изменением анодного напряжения при неизменном напряжении на сетке. Но при этом потребуется величина ΔU_a большая, чем ΔU_c , так как изменение напряжения на сетке сильнее влияет на анодный ток, чем изменение напряжения на аноде. Отношение этих двух величин, каждая из которых вызывает одинаковое изменение анодного тока, называется *коэффициентом усиления триода по напряжению* μ : $\mu = \left| \Delta U_a / \Delta U_c \right|_{\Delta I_a = \text{const}}$.

Внутреннее сопротивление (динамическое) R_i на каком-либо участке вольт-амперной характеристики определяется как отношение изменения анодного напряжения к изменению анодного тока при постоянном напряжении на сетке: $R_i = \Delta U_a / \Delta I_a \mid_{U_c = \text{const}}$.

Все три параметра S , μ , R_i связаны так называемым внутренним уравнением триода: $SR_i = \mu$, что легко показать перемножением этих параметров.

При подаче на участок сетка—катод некоторого напряжения (например, напряжения усиливаемого сигнала биоэлектрической активности) анодный ток изменится на величину ΔI_a . Изменение анодного тока будет происходить по закону изменения напряжения на сетке (напряжения входного сигнала), повторяя форму этого напряжения.

Входная цепь лампы. Участок сетка — катод лампы, куда подключается источник усиливаемого напряжения (сигнала), является входной цепью лампы. Если сетка лампы в какой-то момент времени будет заряжена по отношению к катоду положительно, то часть электронов, выходящих из катода, будет оставаться на сетке, создавая во входной цепи сеточный ток. Этот ток, протекая через источник входного сигнала и создавая падение напряжения на его внутреннем сопротивлении, вызовет появление искажений сигнала.

Очевидно также, что при усилении сигналов биоэлектрической э. д. с. в случае отведения их от различных живых тканей, необходимо избегать неблаго-

приятного воздействия, оказываемого на них сеточными токами. Кроме того, наличие относительно больших сеточных токов свидетельствует о достаточно низком входном сопротивлении участка сетка—катод лампы, что противоречит условию, предъявляемому к входному сопротивлению измерительных устройств, например усилителей напряжения.

При отрицательных по отношению к катоду напряжениях на сетке электроны, испытывая тормозящее действие, частично возвращаются на катод, но большая их часть под действием электрического поля анода проходит управляющую

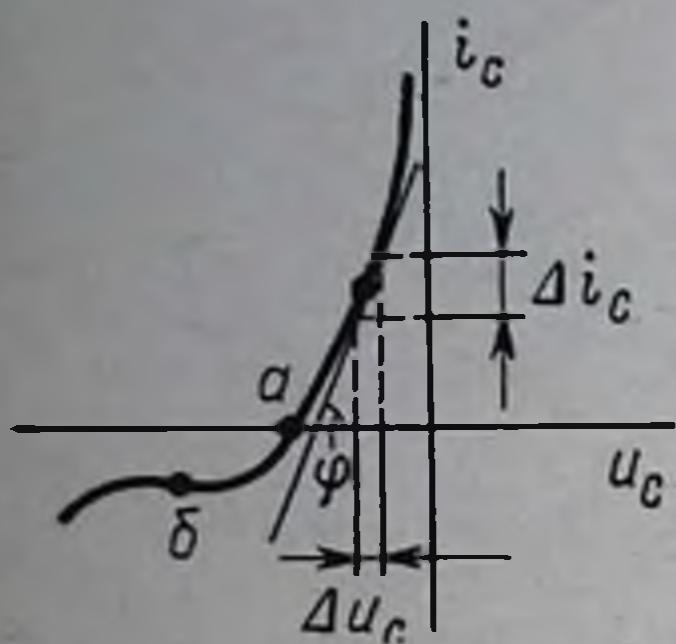


Рис. 18. Зависимость сеточного тока электронной лампы от напряжения на сетке

сетку и достигает анода. При этом (в идеальном случае) сеточные токи отсутствуют, а входное сопротивление лампы бесконечно велико. Поэтому обычно в сеточную цепь лампы вводят постоянное отрицательное напряжение — *напряжение смещения* $U_{см}$, источник которого соединяется последовательно с источником входного сигнала $U_{сг}$. При этом для абсолютных значений этих величин должно соблюдаться условие $|U_{см}| > U_{сг}$.

В реальных условиях, несмотря на работу электронных ламп с отрицательным напряжением смещения, сеточные токи достигают $10^{-9} \div 10^{-8}$ А, и только в специальных электрометрических лампах они могут быть менее 10^{-14} А. Появление сеточных токов объясняется различными побочными явлениями, происходящими в лампе. Например, несмотря на вакуум, в лампе всегда имеются положительные ионы, образующиеся в результате ионизации молекул газа электронами. Эти ионы, попадая на сетку, образуют один из компонентов сеточного тока.

Входное сопротивление лампы связано с протеканием во входной (сеточной) цепи тока. Как правило, зависимость сеточного тока от напряжения на сетке $i_c = F(U_c)$ имеет вид, изображенный на рис. 18. Величина входного сопротивления, определяемая этой нелинейной характеристикой, вычисляется около предполагаемого рабочего участка как $R_{вх} = \Delta U_c / \Delta i_c$.

Более точно $R_{вх}$ в любой точке кривой определяют как производную от напряжения по току (рис. 18): $R_{вх} = dU_c / di_c = 1/\chi'(U_c) = 1/\text{tg}\varphi$.

Для оценки возможностей применения триода существенно знать величины так называемых межэлектродных емкостей лампы. Паразитная емкость, образующаяся между сеткой и катодом, называется *входной емкостью лампы*. Емкость анод-катод называется *выходной емкостью*, а емкость анод-сетка — *проходной емкостью*. Наличие паразитных емкостей электронных ламп может оказать заметное влияние на работу усилительных схем, особенно на высоких частотах. Межэлектродные емкости шунтируют входные и выходные цепи, в результате чего снижается коэффициент усиления усилительных схем и искажается форма усиливаемых сигналов.

УСИЛИТЕЛИ НАПРЯЖЕНИЯ

Схема однокаскадного усилителя напряжения изображена на рис. 19, А. Обычно вместо батареи, обеспечивающей отрицательное напряжение смещения на сетке, применяют так называемое автоматическое смещение, создаваемое в результате падения постоянной составляющей напряжения на сопротивлении R_k при прохождении анодного тока (R_k — сопротивление в цепи катода). Непосредственно на сетку создаваемый таким образом отрицательный по отношению к катоду потенциал подается через сопротивление R_c . Это сопротивление одновременно является входным сопротивлением каскада, поэтому к нему должны предъявляться определенные требования.

Изменение анодного тока, ΔI_a , вызванное входным сигналом, приводит к падению напряжения на R_a , включение которого в схему позволяет получить усиление сигнала по напряжению $\Delta U_a = U_{вых} = \Delta I_a R_a$.

Усиленное напряжение входного сигнала ΔU_a через емкость C подводится к выходным клеммам усилительного каскада. В точках *аб* кроме ΔU_a действует

постоянная составляющая напряжения $U_{a0} = E - I_0 R_a$. Назначение конденсатора C_c — не пропустить эту часть напряжения на вход следующего каскада усиления или измерительного прибора. Наличие разделительной емкости C в схеме ограничивает его применение случаями усиления переменных напряжений, например импульсных, синусоидальных и т. д. Такие усилители называются усилителями переменного тока или напряжения.

Сопротивление R_{C_1} , относящееся к входной цепи следующего каскада усиления или измерительного устройства, паразитная емкость C_0 , образующаяся

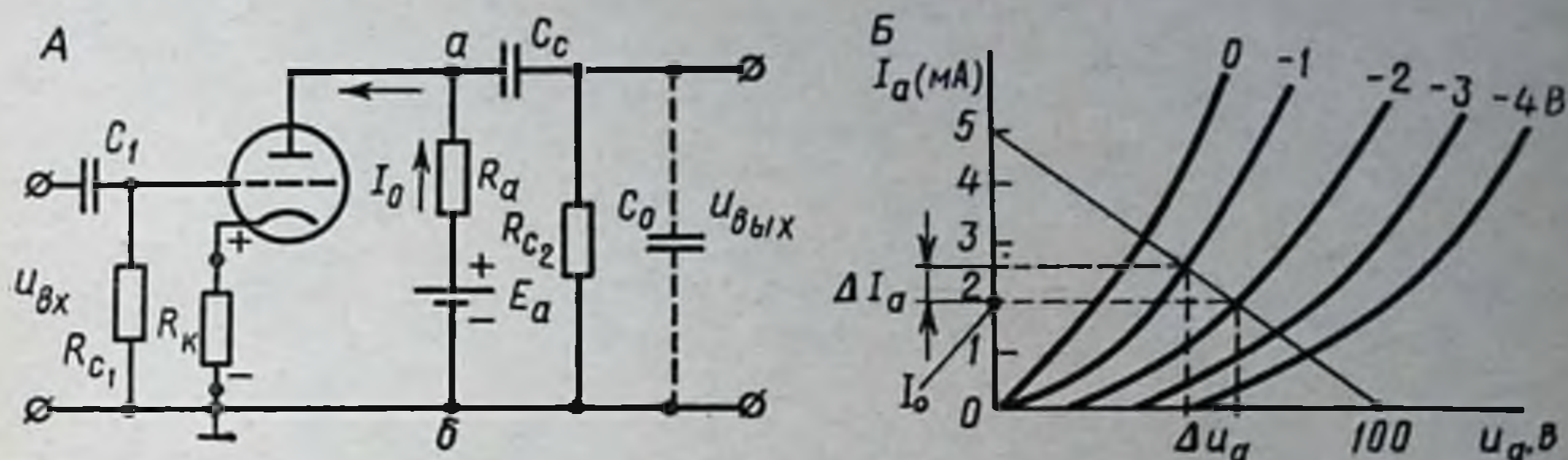


Рис. 19. Схема однокаскадного усилителя (А) и иллюстрация к графическому расчету его основных режимов (Б)

на выходе каскада и состоящая из межэлектродной емкости лампы $C_{ак}$, входной емкости лампы следующего каскада $C_{вх2}$ и монтажной емкости C_m , влияет на характеристики усилительного каскада.

Пример. По заданным вольтамперным характеристикам (рис. 19, Б) усилительной электронной лампы определить режим ее работы и коэффициент усиления каскада. $R_a = 20$ кОм, $U_{вх} = 0,5$ В, $E_a = 100$ В.

1. Задаемся значением отрицательного смещения на сетке $U_{см} = -2$ В. 2. Определяем величину анодного тока покоя I_0 , протекающего через лампу в отсутствие сигнала на входе схемы. Для этого строим линию нагрузки, пользуясь формулой $I = E/R_a - U_a/R_a$, ее пересечение с осью абсцисс будет происходить в точке $E_a = 100$ В, с осью ординат — в точке $I_a = E_a/R_a = 100/20 \times 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3}$ А = 5 мА. Пересечение линии нагрузки с выбранной вольтамперной характеристикой $I_0 = 2$ мА. 3. Чтобы обеспечить выбранное напряжение смещения $U_{см} = -2$ В, необходимо включить в схему R_k : $R_k = |U_{см}|/I_0 = 2/2 \cdot 10^{-3} = 1000$ Ом = 1 кОм. 4. При подаче на вход усилителя напряжения $U_{вх} = 1$ В суммарное напряжение на сетке станет равным $U_c = -1$ В. Как видно из графика, анодный ток изменится на величину $\Delta I_a = 0,5$ мА. Изменение напряжения на R_a достигнет величины $\Delta U_a = \Delta I_a R_a = 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot 20 \cdot 10^3 = 10$ В. 5. Коэффициент усиления каскада $K = U_{вх}/U_{вх} = 10/0,5 = 20$. 6. Кроме напряжения ΔU_a на выходе каскада (до разделительной емкости C_c) имеется постоянное напряжение $U_{a0} = E - I_0 R_a = 100 - 2 \cdot 10^{-3} \cdot 20 \cdot 10^3 = 60$ В. Эта часть напряжения отсутствует на выходных клеммах из-за наличия емкости C_c .

Усилители постоянного тока. Для усиления постоянных или медленно меняющихся сигналов применяют усилители постоянного тока (или напряжения). В этих усилителях межкаскадная связь, а также связь выходных цепей усилителя с нагрузкой, в частности с измерительными устройствами, осуществляется непосредственно, т. е. без применения разделительных конденсаторов. В таких усилителях принимают специальные меры, чтобы постоянное анодное напряжение U_{a0} не попадало на сетку лампы следующего каскада или на измерительное устройство, подключенное к выходной цепи. Для этого, например, при отсутствии $U_{вх}$ встречно U_{a0} в выходную цепь каскада последовательно с включенной на выходе нагрузкой этого каскада включают источник постоянного напряжения с э. д. с. E_k . При полной компенсации напряжение на выходных клеммах будет равно нулю.

При подаче на вход усилителя напряжения $U_{вх}$ на его выходе (как результат усиления) появится ничем не компенсируемое $U_{вых}$.

Основным недостатком усилителей с гальванической связью является неустойчивость их работы, обусловленная тем, что любые изменения напряжения источников питания, параметров ламп и элементов схемы (например, в результате непостоянства температуры) вызывают изменение выходного напряжения. Это явление называется *дрейфом нуля*.

Основные характеристики усилителей. Важными параметрами усилителя являются входное и выходное сопротивления. Точность измерения напряжения

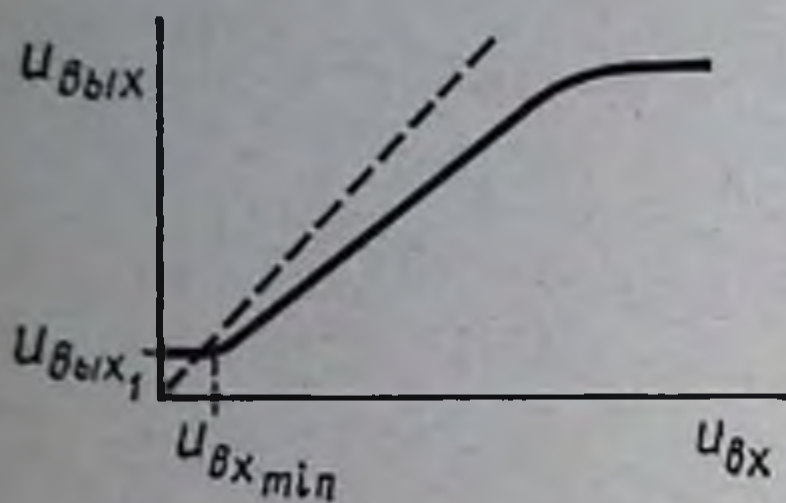


Рис. 20. Идеальная и реальная амплитудные характеристики усилителя

находится в прямой зависимости от величины отношения входного сопротивления измерительного прибора к внутреннему сопротивлению источника измеряемого сигнала, т. е. $R_{вх} \gg R_{вн}$.

Усилительный каскад с сопротивлением нагрузки R_n может рассматриваться по отношению к этой нагрузке как источник напряжения со своим внутренним сопротивлением. Тогда часть выходного напряжения будет теряться на $R_{вн}$, а напряжение на нагрузке будет равно $U_n = U_{вых} R_n / (R_n + R_{вн}) = U_{вых} / (1 + R_{вн} / R_n)$.

Чем меньше отношение $R_{вн} / R_n$, тем больше U_n . Это значит, что согласование выходных цепей усилителя с нагрузкой осуществить тем легче, чем меньше внутреннее сопротивление усилителя.

Амплитудной характеристикой усилителя называется зависимость напряжения выходного сигнала от напряжения на входе $U_{вых} = F(U_{вх})$ (рис. 20). Реальная характеристика представлена сплошной линией. Ее нелинейность обусловлена наличием в схеме нелинейных элементов (например, электронных ламп).

Область амплитуд сигналов $U_{min} - U_{max}$, в пределах которых амплитудная характеристика линейна, называется *динамическим диапазоном усилителя*. Начальному участку амплитудной характеристики соответствует некоторое выходное напряжение $U_{вых1}$ (при $U_{вх} = 0$), обусловленное собственными шумами усилителя.

Частотной характеристикой усилителя называется зависимость его коэффициента усиления от частоты входного синусоидального напряжения. Идеальная частотная характеристика представляет собой прямую, параллельную оси абсцисс (оси частот). Это значит, что коэффициент усиления постоянен во всей полосе частот, необходимых для неискаженного воспроизведения какого-нибудь сигнала.

Реальная частотная характеристика усилителя показана на рис. 21. Коэффициент усиления имеет свое полное значение только в некотором диапазоне средних частот и понижается на низких и высоких частотах. В этом случае условия правильного воспроизведения усиливаемого сложного сигнала могут быть выполнены с той или иной степенью приближения. Например, чтобы обеспечить усиление сложного сигнала с приемлемыми искажениями, коэффициент усиления K на граничных частотах f_H и f_B должен быть не ниже чем 70% от максимального значения K_0 .

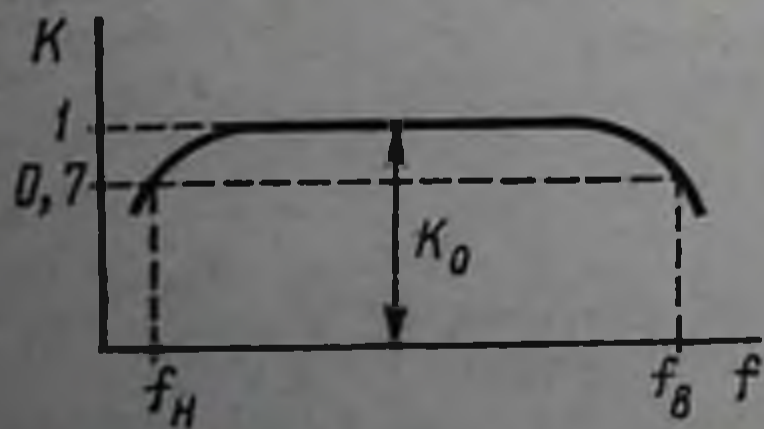


Рис. 21. Частотная характеристика усилителя

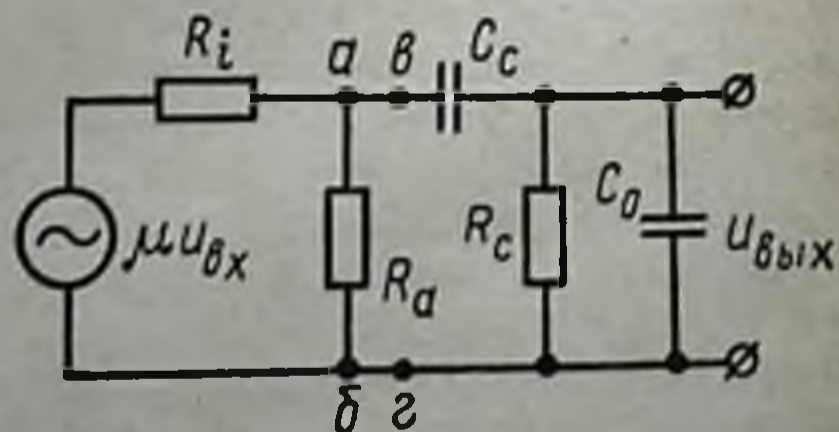


Рис. 22. Эквивалентная схема однокаскадного усилителя

Искажения частотной характеристики, как правило, обусловлены наличием в тракте усиления реактивных элементов.

Заменим каскад усиления (см. рис. 19, А) его эквивалентной схемой (рис. 22). Всю часть схемы влево от точек а—б заменяем источником с напряжением $\mu U_{вх}$, так как входное напряжение $U_{вх}$ усиливается лампой в μ раз (μ — коэффициент усиления лампы). Внутренним сопротивлением этого источника является внутреннее сопротивление лампы R_i . К этой цепи подсоединяем правую часть схемы. Элементы, не влияющие на прохождение усиленного сигнала (к таким элементам относится E_a — источник анодного напряжения), можно опустить.

Реакция этой системы на воздействие гармонического сигнала будет зависеть от частоты этого напряжения. Например, для области низких частот $f_{н}$ сопротивление конденсатора C_c пренебрежимо мало.

Емкость C_0 , как правило, невелика и реально влияет на ход частотной характеристики лишь в области высоких частот. Ее сопротивление для средних частот можно принять равным бесконечности, что соответствует разомкнутой цепи.

Для средних частот $U_{вых} = \mu U_{вх} R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$, где $R_{общ} = R_i \times R_a (R_i + R_a)^{-1}$. Тогда коэффициент усиления $K = U_{вых}/U_{вх} = \mu R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$ не зависит от реактивных элементов схемы и поэтому имеет максимальное значение.

Для низких частот необходимо учесть C_c . Пользуясь методом эквивалентного генератора (рис. 22), левую часть схемы до точек а, б заменяем источником напряжения с $U_{эп} = \mu U_{вх} R_a (R_i + R_a)^{-1}$ и $R_{эп} = R_i R_a (R_i + R_a)^{-1}$, $U_{эп}$ и $R_{эп}$ — соответственно напряжение и внутреннее сопротивление эквивалентного источника на низких частотах.

Правая часть схемы для низких частот представляет собой дифференцирующую RC-цепь с постоянной времени $\tau_{н} = C_c (R_c + R_{эп})$.

Частотная характеристика такой RC-цепи имеет «завал» в области низких частот (см. рис. 15, Б).

На высших частотах в эквивалентной схеме сопротивление емкости C_c мало, но растет влияние емкости C_0 .

В эквивалентной схеме $U_{эв} = \mu U_{вх} R_{общ} / (R_i + R_{общ})^{-1}$ и $R_{эв} = R_i R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$.

На высших частотах усилитель ведет себя как интегрирующая RC-цепь с постоянной времени $\tau_{в} = R_{эв} C_0$. Частотная характеристика этой цепи имеет вид, изображенный на рис. 14, Б.

Таким образом, неравномерность частотной характеристики усилителя на граничных частотах обусловлена влиянием RC-цепей, а ширина полосы частот связана с постоянными времени этих цепей.

Чувствительность усилителя характеризуется отношением минимального напряжения входного сигнала, который можно усилить с использованием данной схемы к показанию индикатора выходного напряжения. Например, при чувствительности 20 мкВ/см входному сигналу в 20 мкВ соответствует выходное напряжение, регистрируемое индикатором (например, осциллографом) в линейных единицах, равное 1 см. Чувствительность усилителей биопотенциалов очень высока и, как правило, ограничивается напряжением собственных шумов усилителя.

Уровень шума в усилителях обусловлен, в основном, тепловым шумом, возникающим в элементах схемы, а также собственным шумом ламп и транзисторов. Тепловой шум сопротивлений связан с тепловым движением электронов внутри проводника, носящим хаотический характер и приводящим к возникновению непериодического напряжения на зажимах сопротивления. Тепловой шум обладает равномерным частотным спектром. Квадрат действующего напряжения шума пропорционален полосе частот, а его энергия — абсолютной температуре вещества. Напряжение теплового шума $U_{шт}$ определяется формулой Найквиста, которая при температуре 25 °С имеет вид: $U_{шт} = 1,3 \cdot 10^{-10} \sqrt{R \Delta f}$, где Δf — ширина полосы пропускания усилителя.

Наиболее сильно на работе усилителя сказываются шумы, возникающие в первом каскаде усиления (в частности, шумы суммарного сопротивления на входе), так как для них коэффициент усиления максимален.

Оценим $U_{шт}$ для усилителя, имеющего $R_{вх} = 10$ МОм, $\Delta f = 10$ кГц.

Пусть сопротивление исследуемого объекта $R_{вн} = 1 \text{ МОм}$, и тогда, естественно, суммарное сопротивление будет определяться в основном значением $R_{вн}$ и $U_{шт} = 1,3 \cdot 10^{-10} \sqrt{10^6 \cdot 10^4} = 1,3 \cdot 10^{-5} = 13 \text{ мкВ}$.

Отсюда видно, что выигрыша в чувствительности, т. е. лучшего соотношения сигнал—шум усилительной схемы, можно добиться сужением полосы частот Δf , но это возможно лишь при условии, что частотный спектр регистрируемого сигнала имеет более низкие пределы, чем Δf .

ОБРАТНЫЕ СВЯЗИ В УСИЛИТЕЛЯХ

Если некоторую часть выходного напряжения усилителя подать на его вход, то можно осуществить обратную связь в усилителе (рис. 23). В этой схеме β —

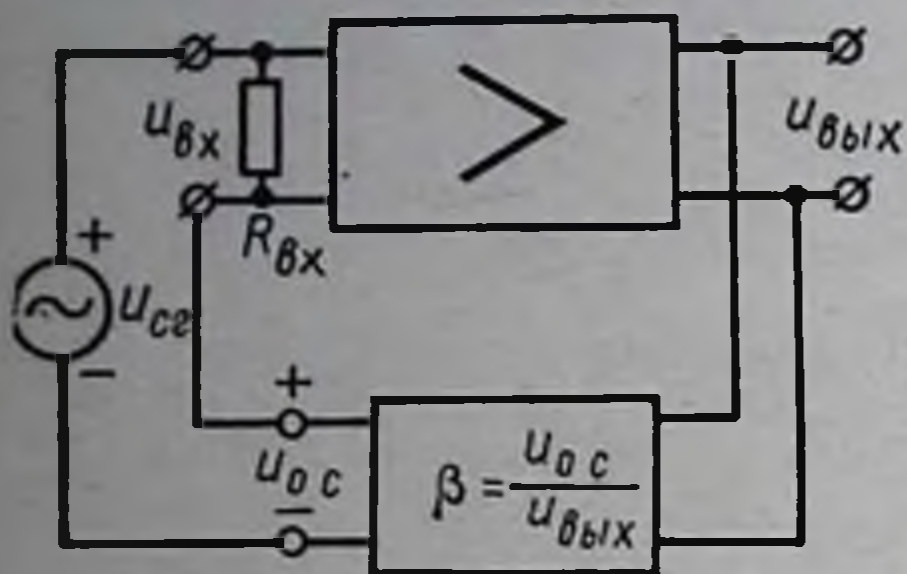


Рис. 23. Структурная схема усилителя с обратной связью

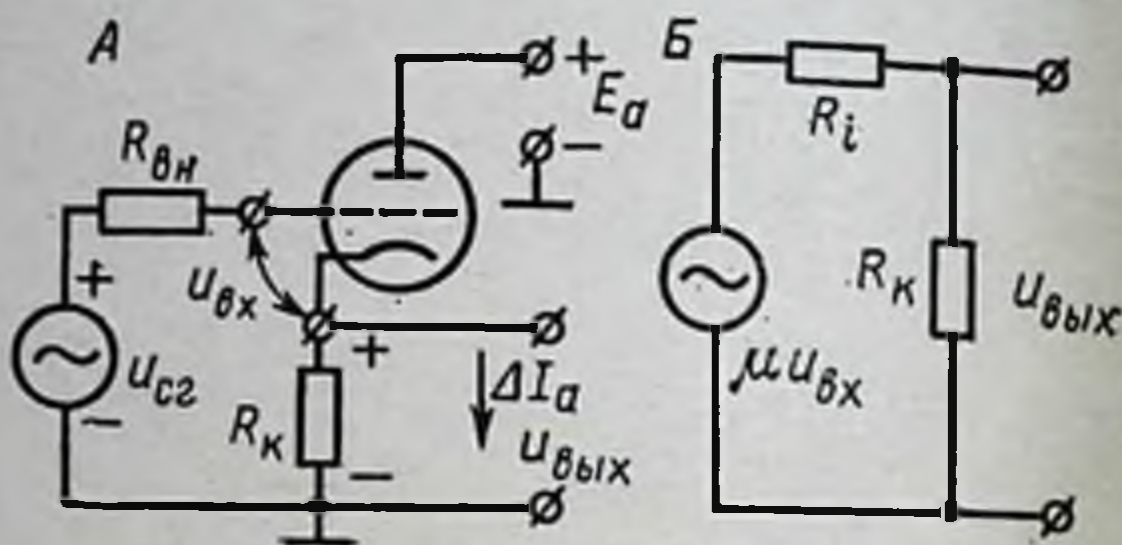


Рис. 24. Катодный повторитель (А) и его эквивалентная схема (Б)

коэффициент передачи обратной связи, показывающий, в каком соотношении напряжение обратной связи $U_{ос}$ находится с выходным напряжением. При положительной обратной связи напряжение $U_{ос}$ находится в фазе с напряжением сигнала $U_{сг}$, при отрицательной — $U_{сг}$ и $U_{ос}$ противофазны (направлены встречно). На рис. 23 расстановка знаков дана для случая отрицательной обратной связи. Напряжение $U_{вх}$ равно алгебраической сумме напряжений сигнала и обратной связи $U_{вх} = U_{сг} - U_{ос}$, а $U_{вых} = KU_{вх} = K(U_{сг} - U_{ос})$, где K — коэффициент усиления усилителя без обратной связи.

Коэффициент усиления с учетом обратной связи: $K' = U_{вых}/U_{сг}$. Принимая во внимание, что $U_{ос} = \beta U_{вых}$, получим выражение для коэффициента усиления с обратной связью: $K' = K(U_{сг} - \beta U_{вых})/U_{сг} = K - \beta K K'$, откуда $K' = K(1 + \beta K)^{-1}$. Соответственно, для положительной обратной связи

$$K' = K(1 - \beta K)^{-1}.$$

Коэффициент усиления при введении отрицательной обратной связи уменьшается, а при положительной — увеличивается. Однако введение отрицательной обратной связи оказывает стабилизирующее действие на коэффициент усиления, уменьшает его зависимость от колебаний питающих напряжений и т. д. Это обусловлено тем, что всякое изменение $U_{вых}$, например, за счет неустойчивости K подается на вход усилителя с обратным знаком, что вызывает компенсацию этого изменения.

Классическим примером усилительного каскада, охваченного 100%-ной отрицательной обратной связью, является каскад с катодной нагрузкой — катодный повторитель (рис. 24). Предположим, что падение напряжения $U_k = I_0 R_k$, вызванное протеканием тока покоя I_0 , компенсировано некоторым образом, в выходной цепи. При подаче на вход сигнала $U_{сг}$ в результате изменения анодного тока на величину ΔI_a напряжение на выходе каскада $U_{вых} = \Delta I_a R_k$, т. е. $U_{вых}$ имеет такой же знак, как $U_{сг}$. Из схемы следует, что $|U_{ос}| = U_{вых}$ и $U_{сг}$ и $U_{ос}$ направлены встречно (противофазно). Таким образом, выходное напряжение одновременно является напряжением обратной связи. Напряжение, действующее непосредственно на входе лампы (на участке сетка-катод), равно $U_{вх} = U_{сг} - U_{вых}$.

Если бы в катодном повторителе отсутствовала отрицательная обратная связь, то коэффициент усиления можно было бы найти, используя следующую эквивалентную схему (рис. 24, Б), из которой следует $U_{\text{вых}} = \mu U_{\text{вх}} R_{\text{н}} / R_{\text{г}} + R_{\text{к}}$, откуда $K = U_{\text{вых}} / U_{\text{вх}} = \mu R_{\text{н}} / R_{\text{г}} + R_{\text{к}}$. Подставляя это значение в формулу $K' = K(1 - \beta K)^{-1}$ и учитывая, что для катодного повторителя $\beta \approx 1$, получим $K' = K(1 + K)^{-1} = \mu R_{\text{н}} [R_{\text{г}} + (1 + \mu) R_{\text{к}}]^{-1}$, но $\mu = S R_{\text{г}}$ и много больше 1, тогда $K' \approx S R_{\text{н}} (1 + S R_{\text{к}})^{-1}$, т. е. для катодного повторителя K' всегда меньше единицы и стремится к ней при возрастании значения $S R_{\text{н}}$. Таким образом, напряжение на выходе катодного повторителя по полярности и величине «повторяет» напряжение сигнала $U_{\text{сг}}$.

Входное сопротивление лампы катодного повторителя (участок сетка-катод) не является бесконечным, а зависит от протекающего во входной цепи сеточного тока (см. рис. 18). Поэтому было бы ошибочным считать, что, выбрав рабочую точку, где сеточный ток будет равен нулю, мы добьемся получения величины входного сопротивления равной бесконечности. Например, в точке а, где $I_{\text{с}} = 0$ (см. рис. 18), $R_{\text{вх}}$ не равно бесконечности, так как при изменении на входе сигнала на величину $\Delta U_{\text{с1}}$ отношение $\Delta U_{\text{с1}} / \Delta I_{\text{с1}}$ является конечной величиной и даже меньшей, чем $\Delta U_{\text{с2}} / \Delta I_{\text{с2}}$ (точка б), где $I_{\text{с}} \neq 0$.

В катодном повторителе величина изменения сеточного тока определяется не только значением $\Delta U_{\text{с}}$, но и разностью изменений напряжения сигнала и напряжения обратной связи ($\Delta U_{\text{с}} - \Delta U_{\text{ос}}$). Так как $\Delta U_{\text{ос}} = K \Delta U_{\text{с}}$ (где $K < 1$ — коэффициент усиления катодного повторителя), то изменение сеточного тока будет пропорционально величине $\Delta U_{\text{с}} - K \Delta U_{\text{с}} = \Delta U_{\text{с}} (1 - K)$. Так, если $K = 0,9$, ток изменится на 0,1 $\Delta I_{\text{с}}$, и входное сопротивление $R_{\text{вх}} = \Delta U_{\text{с}} / 0,1 \Delta I_{\text{с}}$ увеличится в 10 раз по сравнению с $R_{\text{вх}}$ каскада без отрицательной обратной связи.

Не менее важным достоинством катодного повторителя является низкое выходное сопротивление $R_{\text{вых}}$. Это намного облегчает согласование источников сигналов с различного рода нагрузками, в частности с последующими каскадами усиления, регистрирующими приборами и т. д. Выходное сопротивление катодного повторителя, который со стороны выхода можно рассматривать как источник сигналов, равно его внутреннему сопротивлению. Чтобы найти его, необходимо определить изменение выходного напряжения при включении внешней нагрузки, когда $U_{\text{вх}} = 0$.

В результате подключения $R_{\text{н}}$ потенциал катода (который был раньше равен $I_{\text{о}} R_{\text{к}}$) изменится на величину $\Delta U_{\text{к}}$. Следовательно, произойдет изменение разности потенциалов между сеткой и катодом лампы на величину $\Delta U_{\text{ск}} = \Delta U_{\text{к}}$. Эта величина будет усилена лампой в μ раз. Следовательно, к выходной цепи будет приложено напряжение $\mu \Delta U_{\text{ск}}$, изменение выходного тока, проходящего через лампу и $R_{\text{н}}$ ($R_{\text{к}}$ не учитываем, задаваясь значением $R_{\text{н}} \ll R_{\text{к}}$), выразится соотношением $\Delta I_{\text{вых}} = \mu \cdot \Delta U_{\text{ск}} (R_{\text{г}} + R_{\text{н}})^{-1}$.

Итак, при подключении к выходу катодного повторителя сопротивления $R_{\text{н}}$ напряжение на выходе меняется на величину $\Delta U_{\text{к}}$, а выходной ток — на величину $\Delta I_{\text{вых}}$. Следовательно, выходное сопротивление будет равно $R_{\text{вых}} = \Delta U_{\text{к}} / \Delta I_{\text{вых}} = \Delta U_{\text{к}} [\mu \Delta U_{\text{к}} / (R_{\text{г}} + R_{\text{н}})]^{-1} = R_{\text{н}} / \mu + R_{\text{г}} / \mu$.

Так как обычно $R_{\text{н}} \ll R_{\text{г}}$, то выходное сопротивление катодного повторителя можно считать равным $R_{\text{вых}} \approx S^{-1}$, где S — крутизна лампы. Например, если крутизна лампы в рабочей точке равна 2 мА/В, то выходное сопротивление каскада с катодной нагрузкой будет равно 500 Ом.

УСИЛИТЕЛИ НА ТРАНЗИСТОРАХ

В задачу настоящего пособия не входило подробное изложение физических явлений в полупроводниках, на которых основано действие транзисторов. Поэтому, излагая основные принципы работы электронных схем на примерах с радиолампами, мы коснемся принципов работы транзисторных схем в самых общих чертах в той мере, в какой это необходимо для понимания работы некоторых специальных устройств, применяемых в электрофизиологических исследованиях.

В настоящее время в качестве основных полупроводниковых материалов для изготовления диодов и транзисторов применяют германий и кремний. Полу-

проводники, полученные после специальной технологической обработки монокристаллов этих элементов, могут иметь разные виды проводимостей. Проводимость, обусловленную перемещением вакансий электронов — «дырок», называют *дырочной проводимостью*, а проводимость, осуществляемую электронами, — *электронной проводимостью*.

Различают собственную и примесную проводимость полупроводников. Внешение примесей в полупроводник сильно влияет на его электрические свойства. Примесями считаются, например, атомы или ионы химических элементов, внед-

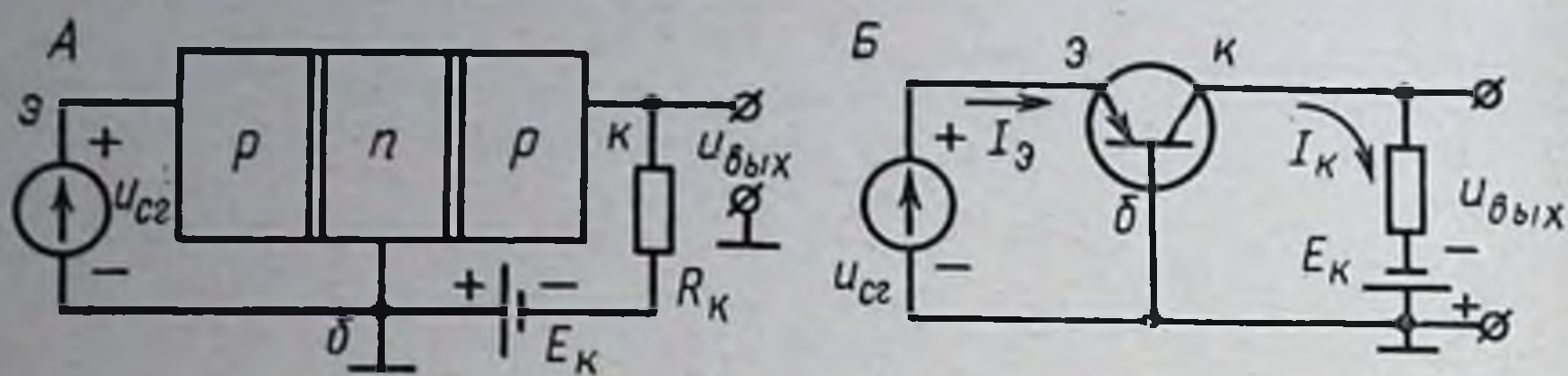


Рис. 25. К рассмотрению работы усилительного каскада на транзисторе, включенном по схеме с общей базой

ренные в кристаллическую решетку полупроводника. Они вносят изменение в периодическое поле кристалла и влияют на поведение электронов и их энергетические уровни. Примеси могут также по-разному влиять на количество носителей тока в полупроводниках. С одной стороны, они могут служить дополнительными поставщиками электронов в кристалл (доноры), с другой — примеси могут быть центрами для «прилипания» электронов, имеющих в кристалле (акцепторы).

При внедрении в кристаллическую решетку полупроводника примесных атомов с тремя валентными электронами в запрещенной зоне полупроводника возникает акцепторный энергетический уровень, а в полупроводнике — дырочная примесная проводимость. Такой полупроводник получил название полупроводник *p-типа*.

При замещении в решетке полупроводника одного из атомов атомом примеси, имеющей пять валентных электронов, в полупроводнике появятся донорные уровни и возникает электронная примесная проводимость. Полупроводники такого типа называются электронными или полупроводниками *n-типа*.

Транзистор полупроводниковый (триод) представляет собой монокристалл германия или кремния, разделенный на три области с поочередно меняющимися типами проводимости. Существует два вида кристаллических триодов: типа *p-n-p* и *n-p-n*. На границах переходов полупроводников с разными типами проводимости образуются потенциальные барьеры, обладающие большим сопротивлением.

Внешние электроды, которые служат для подведения напряжения ко всем трем областям, носящим название *эмиттера*, *базы* (средняя область) и *коллектора*, образуют с полупроводником омические контакты.

Для использования *p-n-p* транзистора в качестве усилителя (рис. 25, А) на коллектор подается отрицательное напряжение E_K , которое значительно увеличивает сопротивление перехода база—коллектор. Сигнал подается на участок база—эмиттер, являющийся входной цепью. При отсутствии тока в этой цепи через коллекторную цепь (управляемую) течет очень слабый ток. Когда напряжение сигнала $U_{сг}$ создаст небольшой ток в цепи эмиттер—база, в предложенной схеме при положительном по отношению к базе эмиттере потенциальный барьер этого перехода понизится и в базу введется (инжектируется) большое число положительных носителей тока (дырок). После прохода через базу носители тока достигают коллекторного перехода, понижая его потенциальный барьер и увеличивая тем самым его проводимость. В результате ток в выходной цепи увеличится.

Принципиальная схема усилителя на транзисторе изображена на рис. 25, Б. Здесь общим электродом для входной и выходной цепей является база. Такая схема называется схемой с общей базой.

На рис. 26, А приведена наиболее распространенная схема усилителя, где общим электродом для входной и выходной цепей является эмиттер (схема с общим эмиттером). При отсутствии входного сигнала проводимость коллекторного перехода определяется постоянной разностью потенциалов между эмиттером и базой $U_{0эб}$ (начальное напряжение смещения), создаваемой батареей $E_{см}$. В цепях базы, эмиттера и коллектора при этом протекают токи $I_{б0}$; $I_{э0}$; $I_{к0}$. Под действием входного сигнала $U_{сг}$, включенного последовательно с батареей

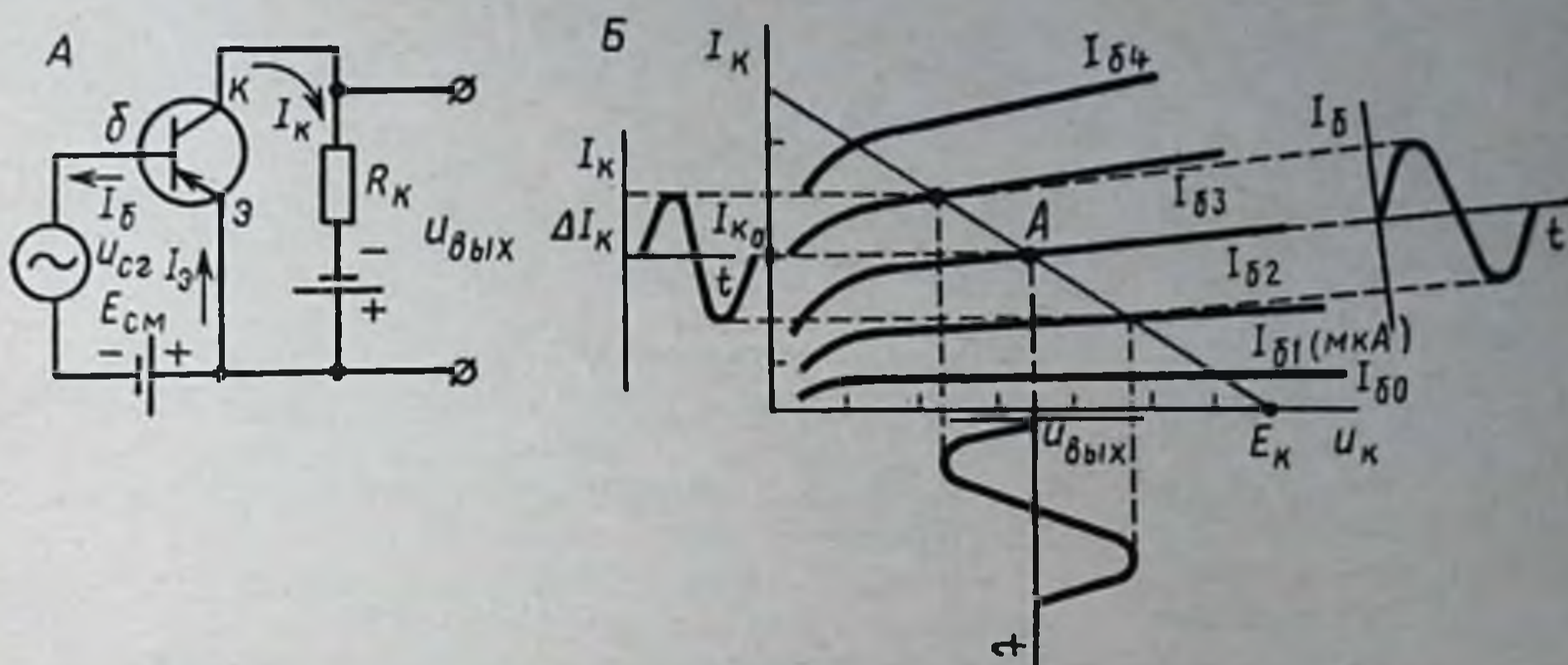


Рис. 26. К рассмотрению работы усилительного каскада на транзисторе, включенном по схеме с общим эмиттером

$E_{см}$, в зависимости от полярности $U_{сг}$ изменяется количество вводимых в базу носителей тока, а следовательно, изменяются соответственно проводимость коллекторного перехода и ток коллектора. Тогда $U_{вых} = \Delta I_k R_k$.

Вольтамперная характеристика транзистора, включенного по схеме с общим эмиттером, представляет собой зависимость тока коллектора от напряжения $I_k = F(U_k)$ при постоянном токе базы I_b . Сняв характеристики при разных значениях I_b , получают семейство так называемых *выходных характеристик*, аналогичных анодным характеристикам лампы, снятым при разных напряжениях на сетке (рис. 26, Б). Нагрузочную характеристику строят так же, как это делается для электронноламповых схем. Координаты пересечения этой характеристики с осями координат $\{E_k, 0\}$, $\{0, I_k = E_k/R_k\}$ (E_k и R_k задаются).

На пересечении нагрузочной характеристики с одной из вольтамперных характеристик выбираем рабочую точку, например точку А (рис. 26, Б). При подаче на входе схемы сигнала, например синусоидального напряжения, ток базы I_b меняется по этому же закону, вызывая соответствующее изменение тока коллектора. Этот ток вызовет падение напряжения на сопротивлении R_k , которое и является выходным напряжением $U_{вых}$.

Схема, изображенная на рис. 26, А, является аналогом ламповой схемы (см. рис. 19) с общим катодом (с анодной нагрузкой). Все виды схем усилителей на транзисторах аналогичны схемам на вакуумных триодах. Транзистор может считаться аналогом лампы, причем эмиттер соответствует катоду, база — сетке, а коллектор — аноду. Однако физические процессы, происходящие в лампах и транзисторах, различны.

Преимуществами транзисторов по сравнению с лампами являются малые размеры, большой к. п. д. (не требуется питания накалов), прочность и т. д. К недостаткам относят наличие сравнительно большого входного тока. В отличие от лампы, управляемой напряжением, транзистор управляется током. В то время как для лампы в усилительном режиме сеточные токи (если они есть) являются помехой, то транзистор не может работать без тока базы. Недостатками являются также низкие значения входных сопротивлений, зависимость параметров характеристик от температуры. Например, схема с общей базой может иметь входное сопротивление не выше 100 Ом, а схема с общим эмиттером до 1,5—

2 кОм. Ламповый каскад с общим катодом может в этих условиях иметь входные сопротивления, измеряемые в мегаомах.

Намного большие значения входных сопротивлений имеет схема с общим коллектором (рис. 27), называемая эмиттерным повторителем (по аналогии с катодным повторителем). Он может иметь сравнительно большое входное сопротивление (до нескольких сот килоом) как результат действия отрицательной обратной связи во входной цепи. Так же как и катодный повторитель, эмиттерный повторитель имеет низкое выходное сопротивление, что очень удобно для согласования с последующими каскадами или измерительными устройствами.

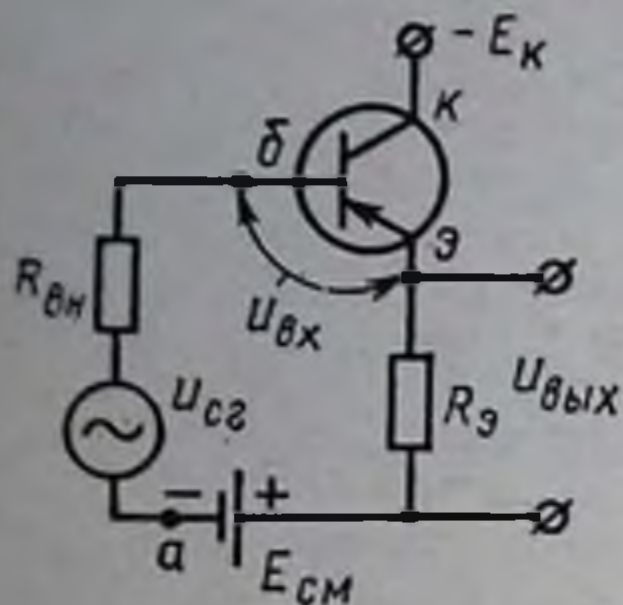


Рис. 27. Схема эмиттерного повторителя

В настоящее время транзисторы широко применяют в электронной аппаратуре, предназначенной для электрофизиологических исследований. Однако до последнего времени решить проблему получения больших входных сопротивлений усилительных каскадов на транзисторах не удавалось. Так, усилители для микроэлектродных исследований строились по гибридным схемам, в которых первый каскад выполнялся на лампе, а остальные — на транзисторах.

Новые возможности в разработке усилителей на транзисторах, в том числе для электрофизиологических исследований, открылись в связи с созданием *полевых транзисторов*. Их основным достоинством является высокое входное сопротивление.

Основой конструкции полевого транзистора является пластинка кремния с дырочной проводимостью, в которой образован тончайший канал с электронной проводимостью. На краях канала имеются участки также с электронной проводимостью, но обладающие меньшим сопротивлением, чем сопротивление канала. Края канала имеют выводы, называемые истоком и стоком. Сама пластинка кремния с дырочной проводимостью является управляющим электродом и называется затвором. Таким образом между затвором и каналом образуется *p-n-переход* (рис. 28, А).

При подключении к стоку положительного относительно истока напряжения в канале возникает электрический ток I_c (рис. 28, Б), создаваемый движением электронов от истока к стоку. При изменении напряжения на затворе изменяется поперечное сечение канала. Например, при увеличении отрицательного потенциала на затворе пространственный заряд *p-n-перехода* расширяется (штриховая линия), а канал сужается. При этом сопротивление канала увеличивается и ток стока I_c уменьшается. При уменьшении отрицательного потенциала будет наблюдаться обратная картина.

На затворе относительно истока должно действовать отрицательное смещение $U_{см}$, определяющее рабочую точку на вольтамперной характеристике транзистора. Подача этого смещения и принцип усиления (электронный поток

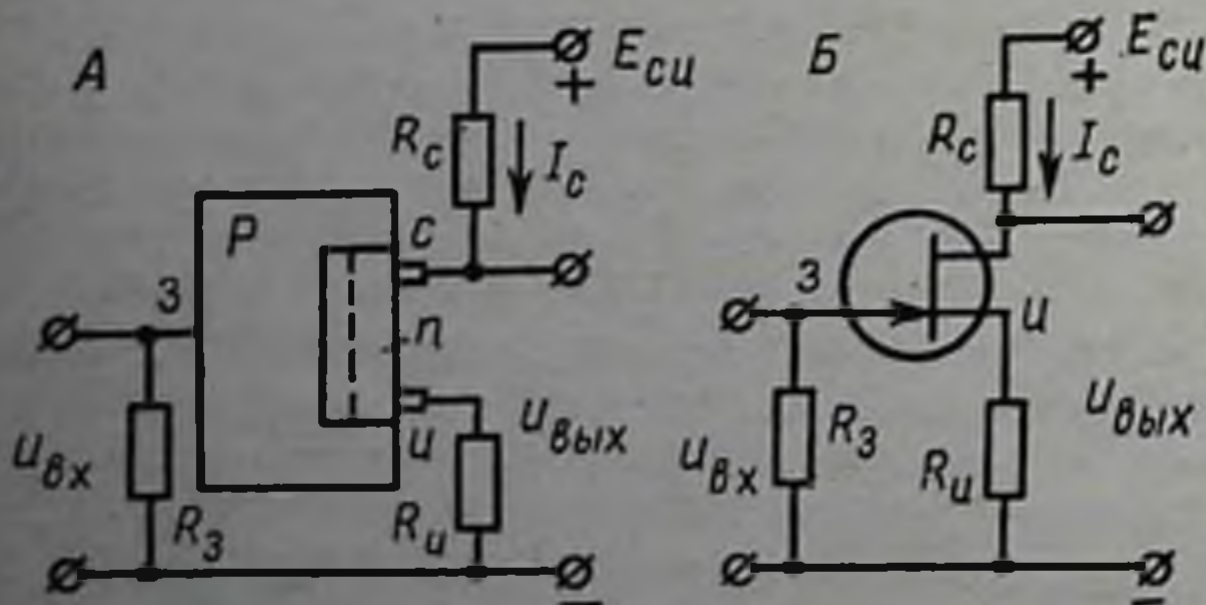


Рис. 28. Схемы усилителя на полевом транзисторе

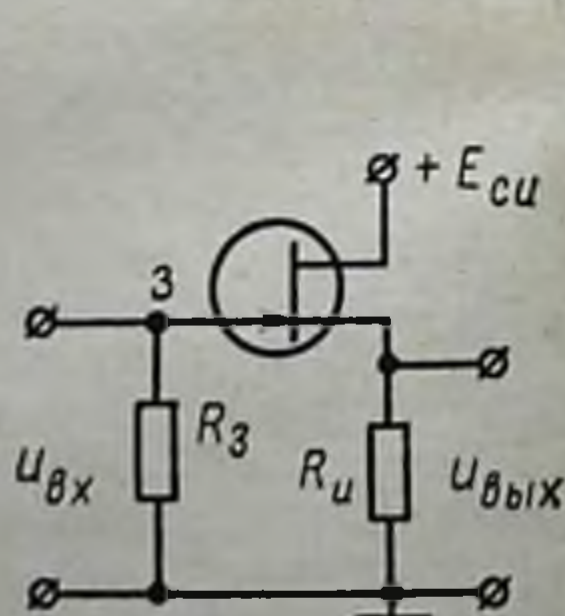


Рис. 29. Схема истокового повторителя

управляется напряжением) происходят, как в ламповых усилителях. Затвор по своему назначению аналогичен сетке лампы, исток — катоду, сток — аноду.

В последние годы входные каскады в электрометрических усилителях для внутриклеточных исследований строятся в основном на полевых транзисторах по схеме истокового повторителя (рис. 29), который благодаря действию отрицательной обратной связи во входной цепи имеет улучшенные характеристики по сравнению с другими видами каскадов.

Входные сопротивления различных схем на полевых транзисторах достигают 10^{11} — 10^{12} Ом, а в схемах, где применяются транзисторы с так называемым изолированным затвором, — до 10^{14} — 10^{15} Ом; входные токи (токи затвора) в таких схемах 10^{-14} — 10^{-10} А.

Рекомендуемая литература: [10; 21; 42; 49; 50].

ЭЛЕКТРОННЫЕ ПРИБОРЫ В ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧАХ БОЛЬШОГО ПРАКТИКУМА

Электронные приборы, используемые в разделах практикума, составляют две группы. *Приборы для отведения и регистрации биоэлектрической активности*: усилители биопотенциалов, усилители для микроэлектродных исследований, электрокардиографы, векторэлектрокардиоскопы, электронные осциллографы, электроэнцефалографы. Они строятся по одной функциональной схеме: усилитель — блок визуального контроля — регистрирующее устройство. *Приборы для электростимуляции*.

В описаниях к задачам будут указаны конкретные типы приборов, выбранных по техническим данным и входящих в ту или иную задачу. Естественно, что в задачах могут быть применены и другие приборы: единственный критерий при замене — аналогия их характеристик с характеристиками приборов указанных типов.

УСИЛИТЕЛИ

В связи с разнообразием форм изучаемой биоэлектрической активности в задачах практикума применяют различные по своим характеристикам электронные усилители. К ним относятся усилители универсального типа и усилители ограниченного назначения, входящие в состав различных приборов. Здесь рассматриваются некоторые характеристики, знание которых поможет в процессе выполнения физиологического эксперимента правильно выбрать, исходя из характера изучаемой активности, нужные параметры усилителя.

Один из важных признаков, по которым классифицируют усилители, — диапазон частот синусоидальных напряжений, в пределах которого усилитель не вносит искажений. Любой электрический сигнал несинусоидальной формы является сложным и может быть представлен суммой синусоидальных составляющих (гармоники). Частотный спектр таких сигналов определяет собой необходимый рабочий диапазон частот (полоса пропускания) усилительного устройства.

Частотной характеристикой усилителя является зависимость его коэффициента усиления от частоты (рис. 30). Полоса пропускания ограничивается нижней граничной, минимальной, частотой и верхней граничной, максимальной, частотой.

Для того чтобы усилить без искажений любой импульс биоэлектрической активности, нужно, чтобы усилитель был способен усилить все компоненты спектра синусоидальных частот, необходимые для правильного воспроизведения этого сигнала. Например, для передачи «быстрых» компонентов импульса необходимо, чтобы цепи усилителя пропускали высокочастотные составляющие спектра сигнала. Пропускание низкочастотных составляющих — необходимое условие усиления постоянного или медленно изменяющегося напряжения. Однако спектр сигналов различной формы может располагаться как в ограниченной, так и бесконечно широкой области частот. Усилительные устройства обладают конечной шириной полосы пропускания, поэтому под условной шириной спектра импульсов понимают все составляющие спектра сигнала, существенные для воспроизведения его формы с заданной точностью.

Нахождение спектров сигнала связано с применением рядов и интегральных преобразований Фурье, что представляет определенную сложность. Задача может быть сведена к более простой оценке искажений отдельных компонентов сигнала при его прохождении через линейные RC -цепи усилительного тракта. Излишняя неравномерность частотной характеристики в области граничных частот может нарушить исходные соотношения между амплитудами компонентов сложного сигнала. Обычно постоянные времени τ_n и τ_b выбирают таким образом,

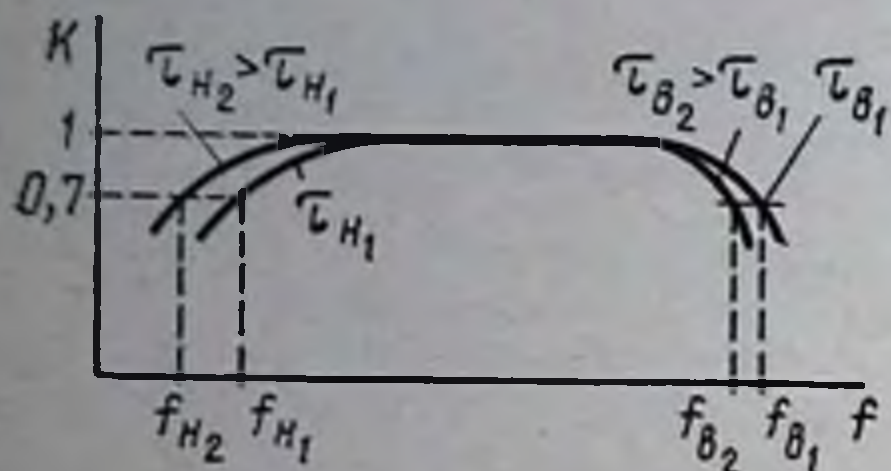


Рис. 30. Частотные характеристики усилителя переменного тока

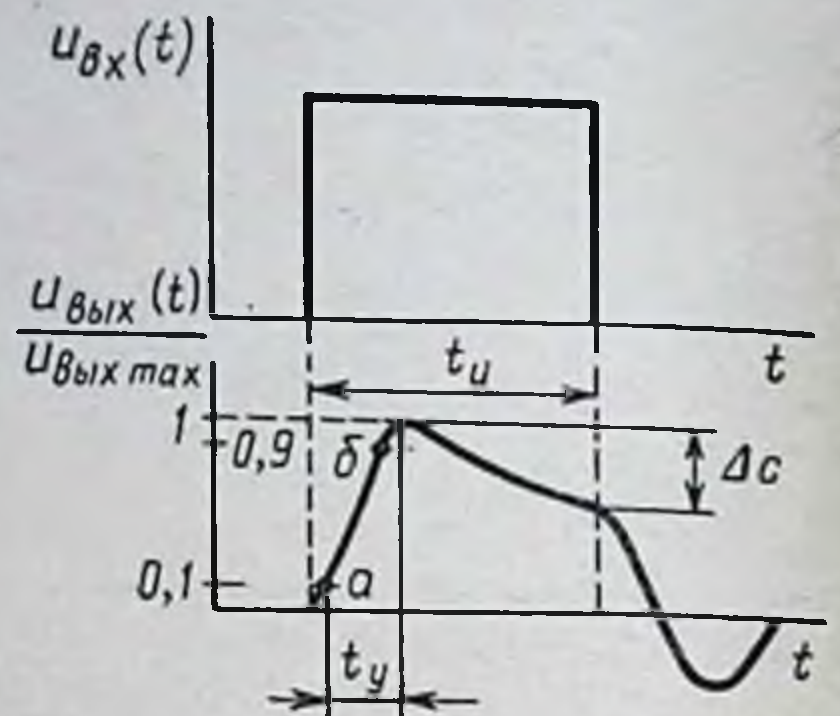


Рис. 31. К определению переходной характеристики усилителя переменного тока

чтобы в точках граничных частот коэффициент усиления составлял примерно 70% от максимального значения (рис. 30). Как известно, граничные частоты связаны с τ_b и τ_n соотношениями $f_b = (2\pi\tau_b)^{-1}$, $f_n = (2\pi\tau_n)^{-1}$, т. е., меняя величины τ_b и τ_n , мы получаем возможность смещать граничные частоты, изменяя полосу пропускания усилителя. Так, одновременное увеличение τ_b и τ_n приведет к сужению полосы со стороны высоких частот и расширению в области низких (рис. 30).

Проведем анализ воздействия прямоугольного импульса на линейные RC -цепи усилителя. Не нарушая общности, результаты этого анализа могут быть распространены на импульсы, встречающиеся в практике электрофизиологического эксперимента, хотя они значительно отличаются от прямоугольных. При прохождении прямоугольного импульса через интегрирующую RC -цепь происходит замедление нарастания напряжения на выходе этой цепи, фронт импульса как бы «затягивается». При прохождении прямоугольного импульса через дифференцирующую RC -цепь по экспоненциальному закону происходит уменьшение напряжения на выходе этой цепи. Это явление искажения вершины («медленная» компонента) прямоугольного импульса иногда называется «скалыванием» плоской части сигнала. Так как усилительный тракт содержит оба вида цепей, то напряжение на выходе усилителя будет отличаться от входного уменьшенной крутизной фронта и «сколотой» вершиной. Такой вид изменения напряжения на выходе называется *переходной характеристикой* (рис. 31).

Переходные искажения, которым подвергается импульс, служат качественными показателями усилителей и характеризуются временем установления t_y (равно времени, в течение которого напряжение на выходе изменяется от 10 до 90% своего максимального значения — точки a и b на рис. 31) и величиной «скола» $\Delta_c = \Delta U_c / U_{max}$, где ΔU_c — напряжение скола. Несложно показать, что время установления связано с постоянной времени τ_b равенством $t_y = 2,2 \tau_b$.

Величина «скола», характеризующая искажения плоской вершины импульса, выражается в процентах относительно максимального значения $U_{ВЫХ}$ и определяется по формуле $\Delta_c = 1 - e^{t_n/\tau_n}$.

При малых искажениях, когда «скол» заведомо не превышает 10%, $\Delta_c \approx t_n/\tau_n$.

Существует тесная связь между частотной и переходной характеристиками усилителей: $\Delta_c = 2\pi f_n t_n$ и $t_y = 0,35 f_b$. Это означает, что искажения

«медленной» компоненты импульса будут тем меньше, чем меньше значение f_H , т. е. чем шире полоса пропускания в области низких частот.

Выражения, связывающие t_y , τ_B , f_B и Δ_c , τ , f_H , могут служить для выбора параметров схемы, для определения граничных частот частотной характеристики при усилении сигналов сложной формы. Параметры Δ_c , t_y , характеризующие искажения прямоугольного импульса, являются своего рода калибровочными величинами, с помощью которых можно определять искажения импульсов раз-

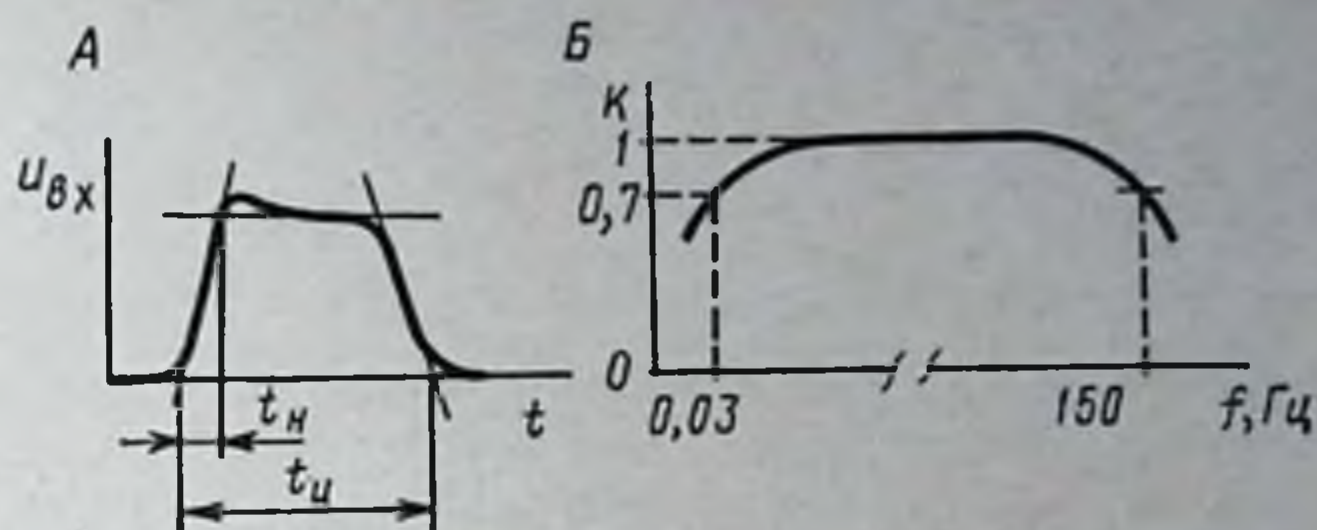


Рис. 32. Импульс монофазной электрограммы (А) и частотная характеристика (Б), соответствующая его воспроизведению без значительных искажений

личной формы. Так, если на вход реального усилителя подать импульс с конечной длительностью фронта нарастания t_H (рис. 32, А), то искажения этого нарастающего напряжения могут быть приближенно учтены по следующей формуле: $t'_H \approx \sqrt{t_y^2 + t_H^2}$.

Пример. Определить полосу пропускания усилителя, необходимую для регистрации импульса монофазной электрограммы (рис. 32, А). Импульс имеет следующие временные характеристики: время нарастания переднего фронта (наиболее «быстрая» компонента) $t_H = 5$ мс, $t_H = 0,5$ с (рис. 32, А дан без соблюдения временных масштабов).

Аппроксимируя компоненты импульса прямыми, определяем t_H и t_H . Исходя из допустимых искажений фронта импульса и его плоской части (условимся, что искажения t_H не должны превышать 10%, т. е. $t'_H = 5,5$ мс), определяем время установления: $t_y \leq \sqrt{(t'_H)^2 - t_H^2} = \sqrt{(5,5)^2 - 5^2} \approx 2,3$ мс.

t_y соответствует верхней граничной частоте частотной характеристики: $f_B = 0,35/t_y = 0,35/2,3 \cdot 10^{-3} \approx 150$ Гц.

Пусть $\Delta_c = 10\%$, тогда величина τ_H разделительных цепей усилителя должна быть $\tau_H \geq t_H/\Delta_c = 0,5/0,1 = 5$ с. Следовательно, $f_H = (2\pi\tau_H)^{-1} = (6,28 \times 5)^{-1} \approx 0,03$ Гц. Примерный вид частотной характеристики для этого случая дан на рис. 32, Б.

Пример. Определить искажения переднего фронта нервного импульса с $t_H = 100$ мкс, если f_B полосы пропускания усилителя равна 2000 Гц. Верхней граничной частоте усилителя соответствует время установления $t_y = 0,35/f_B = 0,35/2 \cdot 10^3 \approx 175$ мкс, откуда $t'_H = \sqrt{t_y^2 + t_H^2} = \sqrt{175^2 + 100^2} \approx 200$ мс.

Расчет показывает, что в результате выбора слишком узкой полосы частот произойдет «затягивание» фронта импульса.

Для сравнительно точного воспроизведения формы импульсов биоэлектрической активности могут быть рекомендованы следующие пределы полосы пропускания усилителя: для нервного импульса 10 Гц — 10 кГц, для ЭКГ 0,2—100 Гц, для ЭГ (монофазной) 0—200 Гц, для ЭЭГ 0,3—200 Гц, для векторэлектрограммы (ВКГ) 0—200 Гц.

В некоторых случаях при отведении монофазной ЭГ (когда t_H достигает значений 1 мс) $f_B = 800$ Гц.

В усилителях биопотенциалов, как правило, предусматривается возможность изменения полосы частот (ступенчатым переключением значений τ_H и τ_B).

Это вызвано необходимостью подавления различного рода мешающих сигналов при избирательной регистрации того или иного процесса. Например, помехами при отведениях нейрограммы («быстрый» процесс) могут быть медленные составляющие от механических движений, дыхания и т. д.

В электрофизиологии применяются также усилители постоянного тока, характерная особенность которых состоит в том, что они могут усиливать сколь угодно медленные электрические сигналы.

Нижняя граничная частота таких усилителей равна нулю ($f_n = 0$, $\tau_n = \infty$). Частотная характеристика в области высших частот в усилителях этого типа имеет тот же вид, что и в усилителях переменного тока.

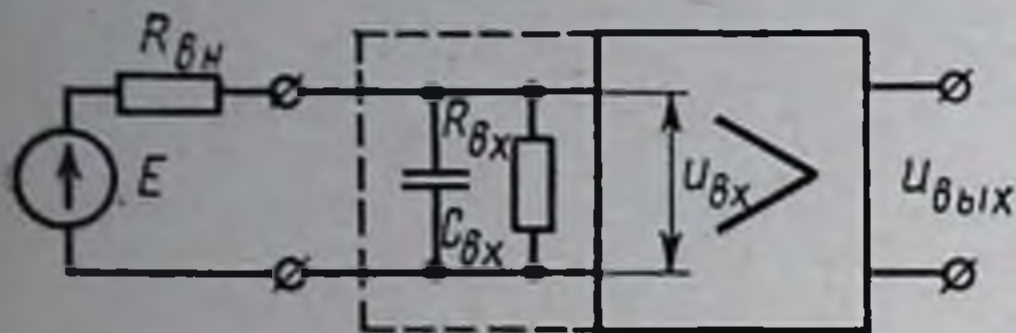


Рис. 33. Эквивалентная схема входной цепи усилителя

Одним из важных показателей, характеризующих работу усилителя, является *входное сопротивление*. Схема измерения э. д. с. источника сигнала E с внутренним сопротивлением $R_{вн}$ при помощи усилителя с входным сопротивлением $R_{вх}$ изображена на рис. 33. $C_{вх}$ — емкость, образованная входной динамической емкостью усилительных элементов (лампы или транзисторы) и емкостью монтажа. При макроэлект-

родных отведениях влиянием этой емкости из-за малых ее значений можно пренебречь.

Напряжение, действующее непосредственно на входных зажимах усилителя, определяется выражением $U_{вх} = ER_{вх}(R_{вн} + R_{вх})^{-1} = E(R_{вн}/R_{вх} + 1)^{-1}$. Если $R_{вн}/R_{вх} \rightarrow 0$, то $U_{вх} \rightarrow E$. Таким образом, точность измерения величины E будет тем больше, чем больше отношение $R_{вх}/R_{вн}$: поэтому в усилителях напряжения, в частности в усилителях биопотенциалов $R_{вх} \gg R_{вн}$.

Внутреннее сопротивление источников биоэлектрической активности может быть самым разным. Так, при внеклеточных отведениях ЭГ, ЭКГ $R_{вн}$ различных источников колеблется от нескольких килоом до нескольких десятков килоом. Поэтому усилители электрокардиографов и векторкардиоскопов имеют входные сопротивления от 500 кОм до 1 МОм.

$R_{вн}$ участков нервных стволов или волокон, от которых отводится активность, могут находиться в пределах от нескольких десятков килоом до нескольких сотен килоом. Этим, в частности, определяется $R_{вх}$ усилителей биопотенциалов, которое обычно равно 5—10 МОм.

При отведении биопотенциалов стеклянными микроэлектродами $R_{вн}$ достигает (в основном из-за сопротивления микроэлектродов) значений 10^7 — 10^9 Ом. Поэтому $R_{вх}$ усилителя в этом случае должно быть не ниже 10^9 — 10^{11} Ом, и тогда необходимо учитывать влияние емкости $C_{вх}$ на прохождение высокочастотных компонентов биопотенциалов.

Как видно из рис. 33, на входе усилителя образуется интегрирующая цепь, постоянная времени которой $\tau_v = R_{вн}C_{вх}$ (при условии, что $R_{вх} \gg R_{вн}$). Это, естественно, приведет к сужению полосы пропускания частот указанной схемы. Так, при сопротивлении микроэлектрода $3 \cdot 10^7$ Ом и входной емкости 10 пФ $\tau_v = 3 \cdot 10^7 \cdot 10^{-11} = 3 \cdot 10^{-4}$ с и верхняя граничная частота $f_{вх} = 1/2\pi\tau_v = 1/(6,28 \cdot 3 \cdot 10^{-4}) = 530$ Гц.

Такое значение полосы пропускания в ряде случаев может оказаться недостаточным. В этом легко убедиться на примере регистрации нервного импульса с временем нарастания переднего фронта $t_n = 200$ мкс. Находим параметры переходной характеристики усилителя с $f_{вх} = 530$ Гц: $t_y = 0,35/f_{вх} = 0,35 \times 530 \simeq 660$ мкс. Тогда передний фронт импульса затянется до величины $t'_n =$

$$= \sqrt{t_y^2 + t_n^2} = \sqrt{660^2 + 200^2} = 700 \text{ мкс.}$$

Недопустимость столь больших искажений очевидна. Поэтому в микроэлектродных усилителях принимается целый ряд мер для уменьшения влияния входной емкости: специальные входные каскады — катодные или истоковые повторители — и схемы с положительной или отрицательной обратной связью, введение которых позволяет нейтрализовать действие входной емкости.

Почти все усилительные устройства, входящие в состав приборов для регистрации биоэлектрической активности, строятся по дифференциальной схеме. К преимуществам таких каскадов усиления по сравнению с обычными однокаскадными можно отнести меньшую величину нелинейных искажений и большую стабильность в работе. Одним из важных свойств дифференциального усилителя является способность подавления внешних помех. Это свойство характеризуется коэффициентом подавления (дискриминации). Например, в используемых в электрофизиологии усилителях биопотенциалов универсального типа УБП1-02, УБП2-03 коэффициент дискриминации равен 10^4 . Такие усилители обладают высокой чувствительностью (не менее 20 мкВ/см) и полосой пропускания от 0,1 Гц до 40 кГц (у некоторых типов $f_B = 15$ кГц). Предусмотрена возможность работы с усилением по постоянному току (в этом случае чувствительность не превышает значений 1 мВ/см), $R_{вх} = 10-15$ МОм. С применением выносных катодных повторителей (УБП1-02) $R_{вх}$ оказывается равным примерно 100 МОм.

Не столь высокие требования предъявляются к характеристикам усилителей электрокардиографов. Реальная чувствительность последних не превышает значений десятых долей милливольт на сантиметр. Нижняя граничная частота равна 0,1—0,2 Гц. В некоторых типах приборов $f_H = 0$. Верхняя граница полосы пропускания ограничивается, как правило, частотными данными регистрирующих (чернилопишущих) устройств, у которых $f_B \approx 100$ Гц.

В экспериментах, связанных с регистрацией ВКГ, используют трехканальные векторэлектрокардиоскопы. На входы усилителей этих приборов подаются два сигнала различных отведений. После усиления один из сигналов подается на вертикальные, а другой — на горизонтальные отклоняющие пластины электронно-лучевой трубки с длительным послесвечением. Полученная на экране трубки ВКГ, своего рода фигура Лиссажу, характеризует пространственное распределение потенциалов сердца. Эти приборы могут быть использованы также для одновременной записи трех стандартных отведений ЭКГ. Полоса пропускания усилителей векторэлектрокардиоскопов 0—400 Гц, чувствительность 0,5 мВ/см.

РЕГИСТРИРУЮЩИЕ ПРИБОРЫ

В качестве регистрирующих приборов в электрофизиологии применяют электромагнитные самописцы с чернильной или тепловой записью, шлейфовые осциллографы, а также приборы для непосредственного фотографирования с экрана электронно-лучевой трубки.

Электромагнитные самописцы (с полосой пропускания от 0 до 100 Гц) используют для записи ЭКГ, ЭГ, кровяного давления и частоты дыхания. *Шлейфовые осциллографы* могут быть использованы для регистрации многих процессов, встречающихся в физиологическом эксперименте, в том числе для записи нейрограмм. Полоса рабочих частот гальванометров шлейфовых осциллографов простирается от нуля до нескольких килогерц. Чувствительность гальванометра определяется величиной отклонения светового луча на плоскости, отстоящей от зеркала гальванометра на расстоянии 1 м, при пропускании тока в 1 мА. Например, гальванометр может иметь чувствительность 40 мм/(мА·м). Это будет соответствовать отклонению луча в 20 мм при прохождении тока в 1 мА и длине луча 0,5 метра.

Для регистрации ВКГ используют встроенную в электрокардиоскоп фотоприставку с лентопротяжным механизмом. С помощью подобных фотоприставок (рекордин) может производиться съемка многих процессов непосредственно с экрана осциллографа.

СТИМУЛЯТОРЫ

В задачах большого практикума используют лабораторные электростимуляторы, широко применяемые в настоящее время в электрофизиологии. Такие приборы являются генераторами прямоугольных импульсов с отдельным регулированием частоты, длительности и амплитуды. Кроме периодического режима в этих стимуляторах предусмотрен ждущий режим, т. е. режим запуска прибора внешними сигналами, и разовый запуск. Предусмотрены также регулируемая временная задержка выходных импульсов относительно запуска. Это позволяет в процессе синхронизации развертки осциллографа сигналом стимулятора

устанавливать выходной сигнал в любой части экрана. В некоторых задачах используют стимуляторы универсального типа с двумя каналами формирования импульсов. 2-й канал может работать в режиме формирования прямоугольных и пилообразных (линейно нарастающие) импульсов. Стимулятор имеет суммирующее устройство, что позволяет получить на общем выходе импульсы 1-го и 2-го каналов. Помимо обычных режимов прибор может работать в режиме периодических или одиночных серий.

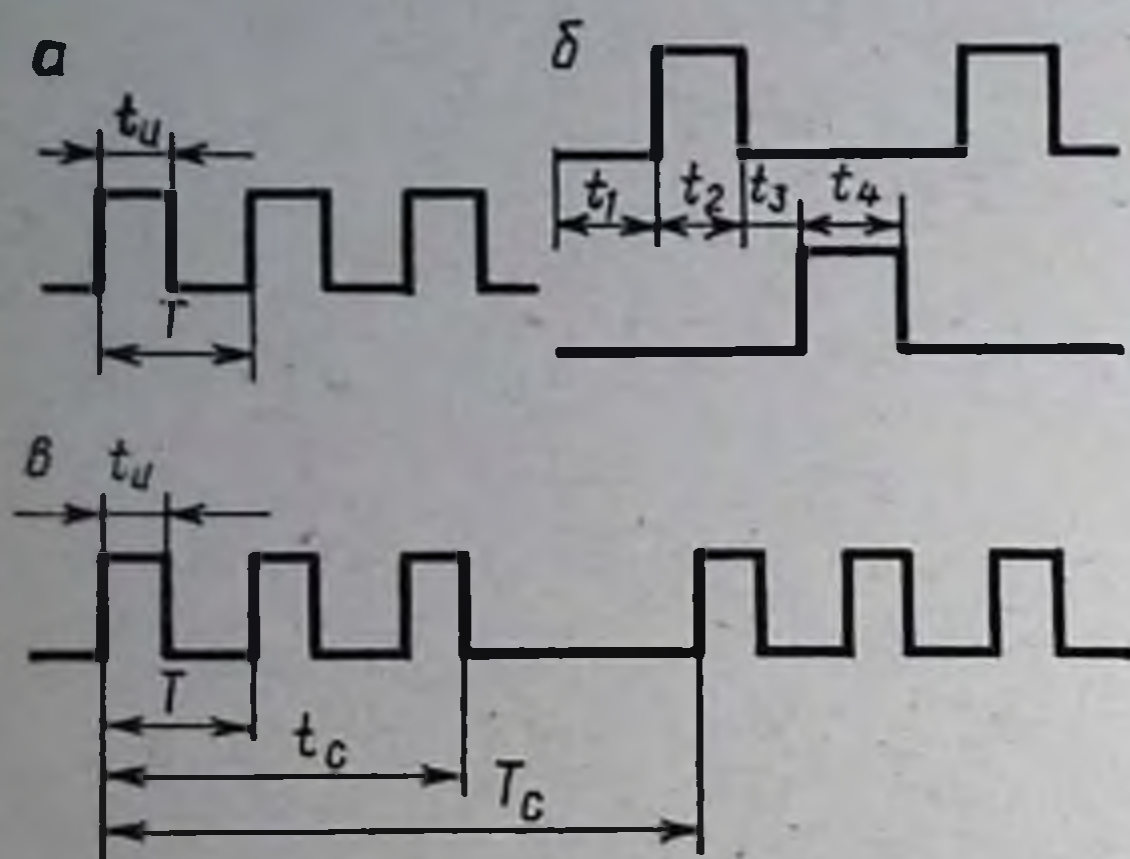


Рис. 34. Последовательности прямоугольных импульсов:

а — в периодическом режиме, б — в периодическом режиме при одновременной работе двух каналов стимулятора и введении задержки, в — в режиме периодических серий

соотношением $t_c = T(n - 1) + t_u$ или $t_c = (1/F)(n - 1) + t_u$, где T и F — соответственно период и частота импульсов в серии, t_u — длительность каждого импульса в серии, n — число импульсов в серии.

Рекомендуемая литература: [10; 17; 31; 40; 54].

ТЕМА 1. УСИЛИТЕЛИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ (УБП)

Общие требования, предъявляемые к УБП. 1. Высокая чувствительность (порядка 5—20 мкВ/см) зависит от используемой полосы частот, которая в свою очередь устанавливается в зависимости от характера исследуемых биопотенциалов. 2. Широкий динамический диапазон (пределы амплитуд регистрируемых сигналов 5 мкВ ÷ 200 мВ). 3. Высокое входное сопротивление (от 10^6 Ом при макроэлектродных отведениях до $\sim 10^9 \div 10^{11}$ Ом при микроэлектродных). 4. Полоса пропускания от 0 до 30—40 кГц. 5. Возможность изменения полосы частот в широких пределах как со стороны низких, так и выс-

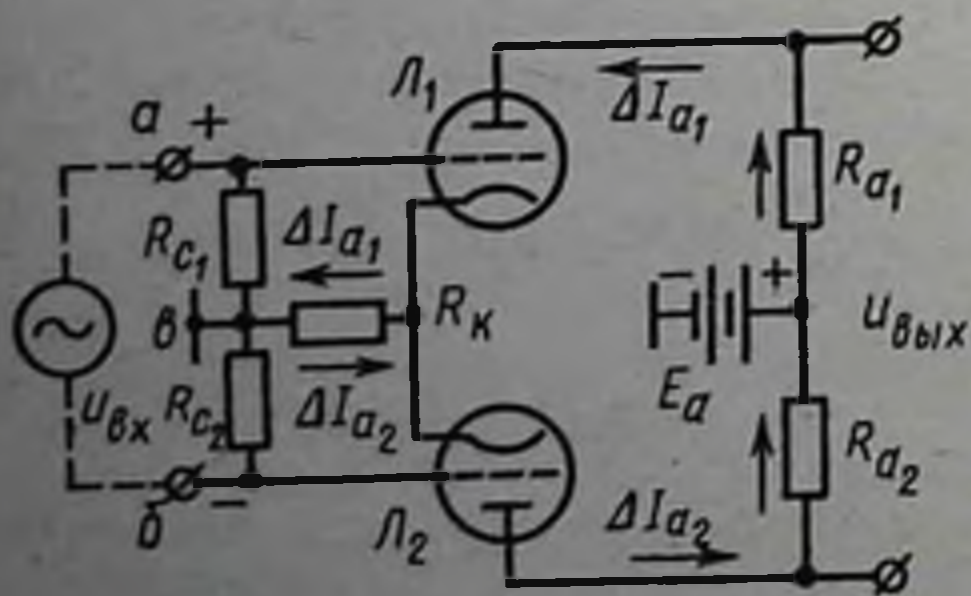


Рис. 35. Схема дифференциального усилителя

Особое внимание при работе со стимуляторами нужно обратить на соблюдение определенных условий при установке частоты, длительности и времени задержки: $t_u < T$ (рис. 34, А) или $t_u F < 1$. При введении времени задержки, а также при суммировании сигналов на одном выходе двух каналов $T > t_{\text{общ}}$ (рис. 34, Б), где $t_{\text{общ}} = (t_1 + t_2 + t_3 + t_4)$. В режиме периодических серий при установке частоты импульсов в серии, а также длительности каждого импульса $1/f > t_u$. При установке частоты серий $t_c < T_c$ (рис. 34, В) или $t_c F_c < 1$, где t_c — длительность серии, T_c — период серий, F_c — частота серий. Длительность серии t_c определяется

соотношением $t_c = T(n - 1) + t_u$ или $t_c = (1/F)(n - 1) + t_u$, где T и F — соответственно период и частота импульсов в серии, t_u — длительность каждого импульса в серии, n — число импульсов в серии.

Рекомендуемая литература: [10; 17; 31; 40; 54].

Дифференциальный усилитель. Дифференциальный усилитель (рис. 35) представляет собой двухтактный усилитель с общим сопротивлением в цепи катодов. При непосредственном подключении к входным клеммам а, б напряжения

исследуемого сигнала (противофазное подключение) потенциалы сеток ламп относительно катодов разнополярны. Если, например, в некоторый момент времени полярность окажется такой, как показано на рис. 35, то в обеих лампах произойдет изменение анодных токов на величину ΔI_a . Причем в анодной цепи L_1 это изменение будет положительным, а в цепи L_2 — отрицательным. И так как эти изменения токов проходят через сопротивления R_{a1} и R_{a2} в одном направлении, то напряжение на выходе усилителя окажется равным $U_{вых} = \Delta I_{a1} R_{a1} + \Delta I_{a2} R_{a2}$.

Существует и другой способ подключения сигнала: точки a и b закорачиваются, а $U_{вх}$ подается на клеммы a и $в$ (синфазное подключение). В этом случае потенциалы сеток ламп относительно катодов однополярны, а изменения анодных токов ΔI_a имеют один знак. Следовательно, напряжение на выходе $U_{вых} = \Delta I_{a1} R_{a1} - \Delta I_{a2} R_{a2}$. При идеальной симметрии схемы $\Delta I_{a1} R_{a1} = \Delta I_{a2} R_{a2}$ и $U_{вых} = 0$.

При противофазном подключении источника сигнала к входным клеммам мы получаем обычное усиление по напряжению, а при синфазном подключении — подавление сигнала, которое осуществляется также в результате действия напряжения отрицательной обратной связи, выделяющегося на общем катодном сопротивлении R_k при прохождении через него токов ΔI_{a1} и ΔI_{a2} . При синфазном подключении они имеют одно направление, и величина напряжения отрицательной обратной связи будет равна $U_{ос} = R_k(\Delta I_{a1} + \Delta I_{a2})$. При противофазном подключении токи ΔI_{a1} и ΔI_{a2} в сопротивлении R_k разнонаправлены и обратная связь в этом случае отсутствует.

Это свойство дифференциального усилителя различать сигналы в зависимости от способа их подключения используют в практике для подавления помех (наводки), носящих синфазный характер. Источниками наводок могут являться различного рода электрические устройства: генераторы, трансформаторы, электронагреватели, электроосветительные лампы и т. д. Большинство наведенных электрических полей возникает так, как это изображено на рис. 36, А. Источник наводок может быть представлен как генератор с одним заземленным полюсом (так как источники переменной э. д. с. одним полюсом заземлены), меняющий свой потенциал относительно заземленного полюса в непосредственной близости от входных зажимов усилителя.

Эквивалентная схема в этом случае (рис. 36, Б) включает емкость C , которая определяется, в частности, расстоянием от источника наводки до объекта, а также габаритами этого объекта. $U_{вх}$ — э. д. с. изучаемого источника, $R_{вв}$ — его внутреннее сопротивление, $R_{вх}$ — входное сопротивление усилителя.

Из схемы видно, что влияние наводки тем меньше, чем меньше C и $R_{вв}$ ($R_{вх}$ можно не учитывать, так как обычно $R_{вх} \gg R_{вв}$). Наведение мешающего сигнала может осуществляться одновременно на обе незаземленные входные клеммы (рис. 36, В). В этом случае наводка по отношению ко входу усилителя носит синфазный характер.

На практике бывает трудно соблюсти условие полной симметрии плеч дифференциального усилителя для всех наводящих сигналов. Поэтому, несмотря на введение в схему усилителя различных симметрирующих устройств, полного подавления синфазного сигнала достичь не удастся.

Степень подавления дифференциального усилителя характеризуется от-

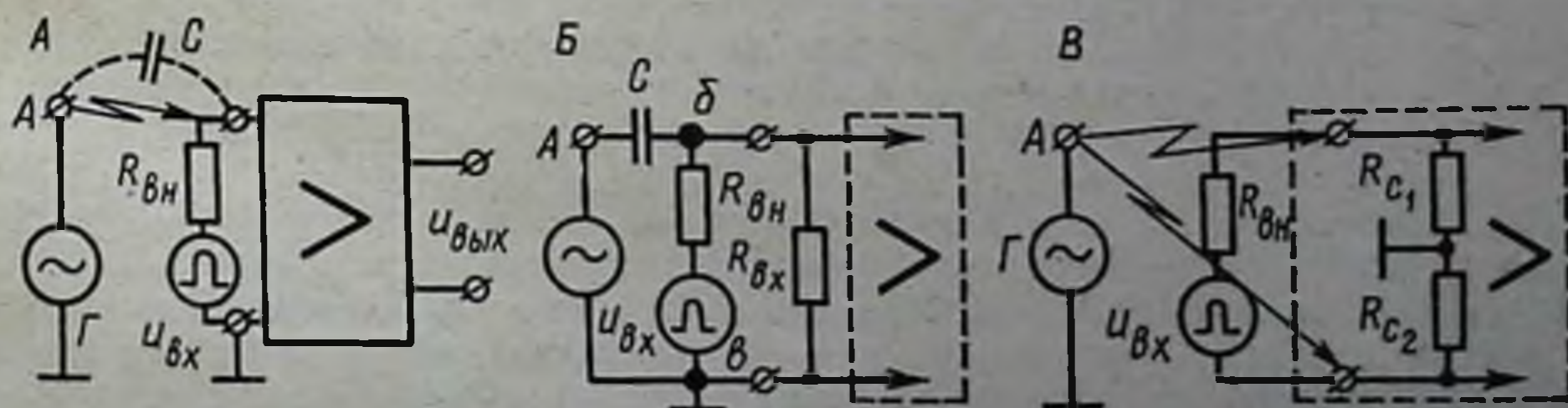


Рис. 36. Эквивалентные схемы наведения сетевого сигнала помехи на входы усилителей

ношением входных напряжений при синфазной $U_{\text{сфн}}$ и противофазной $U_{\text{пр}}$ подаче сигналов и при одинаковых, в обоих случаях, напряжениях на выходе. Эта величина называется коэффициентом дискриминации K_d : $K_d = U_{\text{сфн}}/U_{\text{пр}}$.

Коэффициент усиления одного каскада обычно невелик, поэтому УБП строят по многокаскадной схеме. Межкаскадные связи осуществляются в таких схемах, в основном, двумя способами: по переменному току с применением разделительных емкостей и по постоянному току с непосредственной (гальванической) связью между каскадами.

В некоторых современных УБП в одном усилителе сочетаются оба вида межкаскадных связей (рис. 37). При использовании всего тракта усиления (сигнал

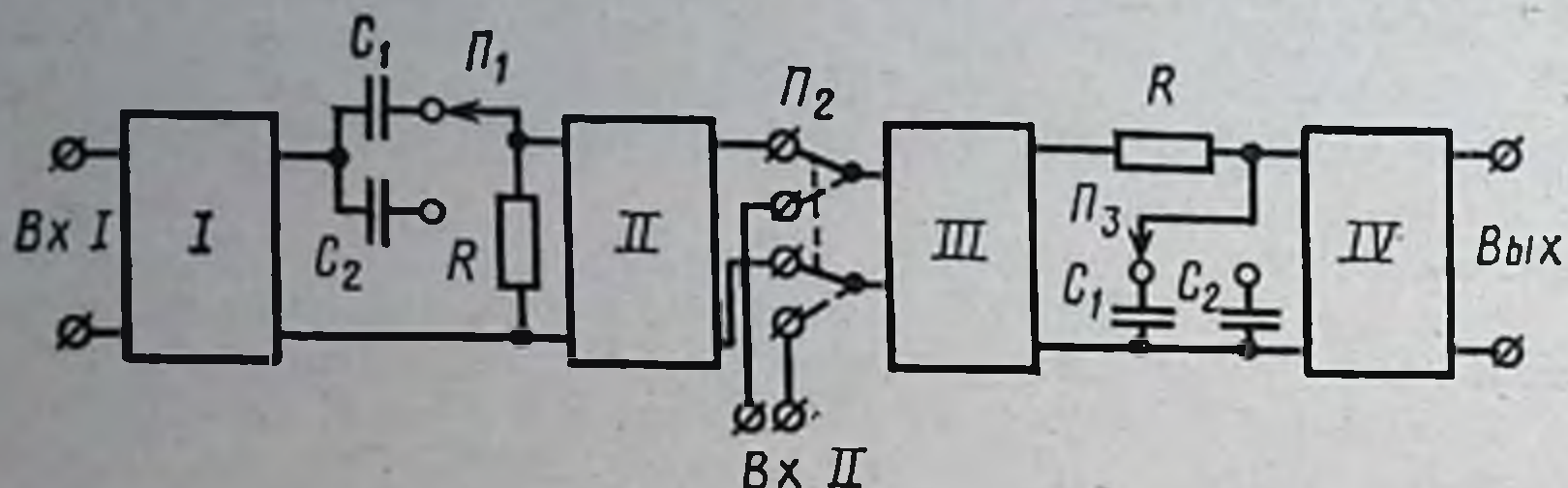


Рис. 37. Структурная схема усилителя биопотенциалов

подключается к клеммам «вход I») схема работает как усилитель переменного тока, коэффициент усиления которого определяется произведением коэффициентов усиления всех четырех каскадов. При использовании «входа II» коэффициент усиления будет меньше, чем в первом случае, так как используются только два последних каскада, однако при этом схема работает как усилитель постоянного тока.

В УБП существует возможность менять полосу частот, ограничивая ее как со стороны низких частот изменением τ_n (переключатель Π_1), так и со стороны высших частот изменением τ_v (переключатель Π_3). Таким образом используется либо вся полоса частот, или ее часть, ограниченная любыми имеющимися пределами. Так, при регистрации быстрых биоэлектрических процессов (нервный импульс) ограничением со стороны низких частот можно избавиться от мешающих медленных процессов, возникающих в результате дыхания, сердечной деятельности и т. д. При регистрации медленно меняющихся напряжений, например ЭЭГ, ограничением полосы со стороны высших частот можно повысить реальную чувствительность, так как при этом уменьшается уровень собственных шумов усилителя. Выбор полосы частот с точки зрения правильного воспроизведения сигнала осуществляется при сопоставлении его временных параметров с переходной характеристикой усилителя, которая должна соответствовать определенной полосе частот.

Выходные каскады УБП строятся также по двухтактной схеме (рис. 38). На выходных клеммах такого каскада при определенных условиях может появиться постоянное напряжение, даже если $U_{\text{вх}} = 0$. Тогда на экране осциллографа при регистрации $U_{\text{вых}}$ произойдет смещение нулевой линии. Напряжение на выходе обусловлено протеканием тока покоя I_0 в анодных цепях и равно $U_{\text{вых}} = \varphi_a - \varphi_b$, где φ_a и φ_b — потенциалы в точках а и б. И только при $\varphi_a = \varphi_b$ $U_{\text{вых}} = 0$. Для баланса схемы в анодную цепь вводится переменное сопротивление R , изменением величины которого достигается выравнивание потенциалов φ_a и φ_b . Этот процесс обычно называется «установкой нуля» или «балансом выхода».

В анодные цепи УБП обычно включают измерительные или регистрирующие приборы с большим входным сопротивлением (например, электронно-лучевую трубку). Регистраторы типа шлейфового гальванометра, имеющие низкое сопротивление (несколько ом), в принципе могут быть включены в катодные цепи (точки в и г). В этом случае токи покоя направлены встречно и, при условии их равенства, не вызовут отклонения указательной системы шлейфа. При подаче сигнала на вход изменение анодных токов ΔI_a в анодных и катодных цепях

будут однонаправлены. Большая часть тока ΔI_a , протекающая через сопротивление R_k , пройдет через цепь шлейфа, так как $R_{ш} \ll R_k$, и вызовет отклонение его подвижной системы. В то же время на выходе появится напряжение $\Delta U_{ab} = \Delta I_a (R_{a1} + R_{a2})$, которое так же, как и ток в шлейфе, будет иметь форму, определяемую законом изменения входного сигнала.

Шлейфовый осциллограф. Шлейфовые осциллографы являются регистрирующими приборами и служат для исследования изменений мгновенных значений

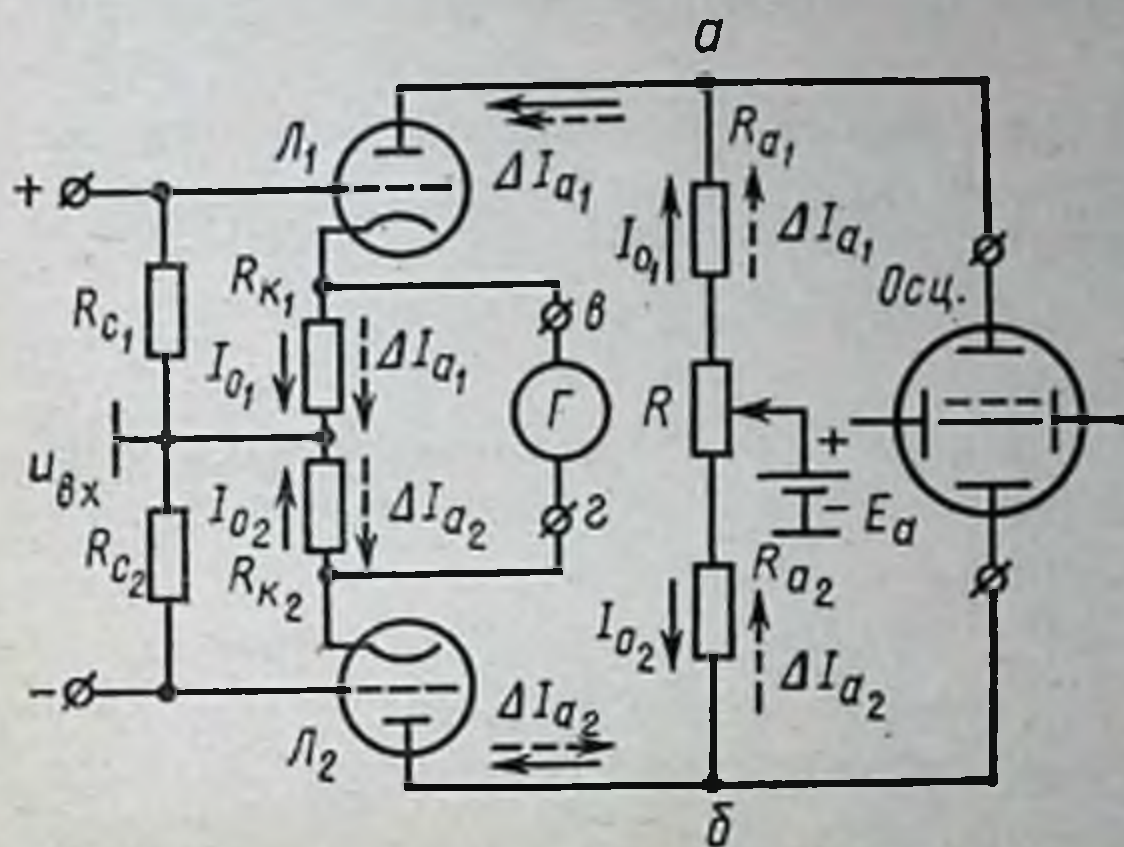


Рис. 38. Схема выходного каскада усилителя биопотенциалов

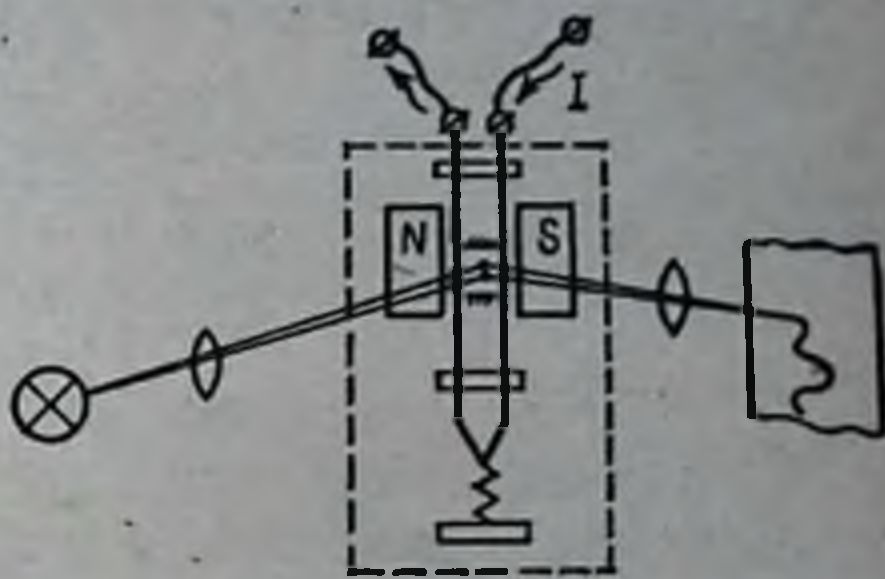


Рис. 39. К принципу работы шлейфового осциллографа

токов и напряжений в диапазоне частот от нуля до нескольких килогерц. Основной элемент шлейфового осциллографа, гальванометр, или шлейф, представляет собой петлю из тонкой металлической ленты, натянутой в узком зазоре постоянного магнита (рис. 39); на среднюю часть петли наклеено миниатюрное зеркало. Оптическая система направляет на зеркало узкий пучок света, который после отражения фокусируется на движущуюся фотопленку (фотобумагу). При протекании тока по петле на последнюю действует вращательный момент и зеркало поворачивается. Угол поворота (в области малых углов) пропорционален току, и отклонение светового пятна от его начального положения на ленте пропорционально сигналу. При движении фотопленки в направлении, перпендикулярном плоскости колебаний зеркала, происходит развертывание процесса во времени и его регистрация.

Шлейфовые осциллографы обычно имеют набор шлейфов с разной чувствительностью и разными частотными характеристиками, причем чем шире полоса частот шлейфа, тем меньше его чувствительность.

Рекомендуемая литература: [21].

Задача 1. Изучение универсального дифференциального усилителя для исследования биоэлектрических потенциалов

Цель работы. Изучить работу дифференциального усилителя на примере типового прибора УБП1-02. Исследовать некоторые характеристики и параметры этого прибора. Научиться выбирать и устанавливать требуемые параметры для изучения определенных биоэлектрических процессов.

Методика. Структурная схема измерительной установки включает последовательно соединенные: стимулятор ЭСЛ-2, усилитель УБП1-02,

осциллограф С1-19. Определяют переходные параметры усилителя УБП1-02 для разных положений переключателей «полоса снизу» и «полоса сверху» (I) и измеряют входную емкость выносного входного каскада (катодного повторителя) (II).

Ход работы. I. 1. Подсоединить выход стимулятора на вход выносного входного каскада (катодного повторителя) несимметрично, соединив одну из входных клемм с клеммой «земля».

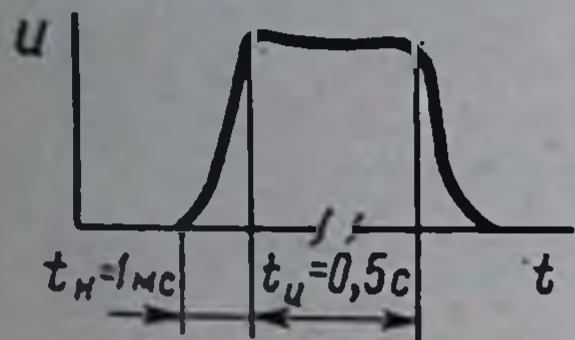


Рис. 40. Импульс монофазной электрограммы сердца

2. Соединить выход синхроимпульса стимулятора с входом «внешняя синхронизация» осциллографа.

3. Установить минимальное значение напряжения на выходе стимулятора.

4. Подсоединить выход усилителя «пластины» к пластинам «y» электронно-лучевой трубки осциллографа.

5. Включить приборы и после 3-минутного прогрева приступить к измерениям.

6. Получить для трех значений переключателя «полоса снизу» устойчивое изображение дифференцированного импульса с установившимся значением амплитуды (при этом переключатель «полоса сверху» должен находиться в положении 10 кГц).

7. Включив метки времени на осциллографе, определить постоянную времени τ_n для трех значений f_n .

8. Пользуясь величинами τ_n , полученными при значениях 10 Гц и 0,1 Гц переключателя «полоса снизу», вычислить искажения Δ_c , которым подвергнется вершина (медленная компонента) монофазной ЭКГ с заданными параметрами (рис. 40).

9. Выключить приборы, отключить симметричный выход усилителя пластин от электронно-лучевой трубки.

10. Подключить другой несимметричный выход («магнитофон») усилителя ко входу «y» усилителя осциллографа.

11. Включить приборы.

12. Установить переключатель «полоса снизу» в положение 10 Гц.

13. Пользуясь большими скоростями разверток и подбирая длительность (в пределах 0,1—20 мс) и частоту импульсов, получить изображение интегрированного импульса с установившимся значением амплитуды.

14. Для всех положений переключателя «полоса сверху» (пользуясь метками времени) определить графически постоянную времени τ_v и время установления t_y .

15. Пользуясь величинами τ_v , полученными при значениях 80 и 500 Гц переключателя «полоса сверху», вычислить искажения, которым подвергнется передний фронт заданной монофазной ЭКГ (рис. 40).

II. 1. На вход выносного входного каскада последовательно с выходом стимулятора включить сопротивление 20 МОм.

2. Повторяя пункты 12 и 13 раздела I, по полученной

осциллограмме интегрированного импульса определить постоянную времени входной цепи $\tau_{вх}$.

3. Вычислить значение входной емкости $C_{вх}$.

4. Зная $C_{вх}$, оценить возможность использования данного усилителя для внутриклеточных отведений биопотенциалов. Указать, какие виды биоэлектрических потенциалов и с какими пределами сопротивлений микроэлектродов можно регистрировать с наименьшими искажениями.

З а д а ч а 2. Изучение усилителя биопотенциалов и регистрирующего прибора — шлейфового осциллографа

Цель работы. Изучить работу усилителей биопотенциалов на примере типового прибора УБП2-03. Исследовать основные характеристики усилителей биопотенциалов. Изучить принципы работы шлейфовых осциллографов на примере типового прибора Н-107.

Методика. Структурная схема измерительной установки включает последовательно соединенные шлейфовый осциллограф Н-107, звуковой генератор ГЗ-109, усилитель УБП2-03, осциллограф С1-68.

Снимают частотные характеристики усилителя и шлейфов (светолучевых гальванометров) (I), определяют коэффициент дискриминации (II) и измеряют напряжение собственных шумов усилителя (III).

Ход работы. / 1. Пользуясь трансформаторным выходом генератора ГЗ-109, подключить его ко входу усилителя симметрично.

2. Установить напряжение на выходе генератора 0,1 В, частоту — 200 Гц.

3. Выход усилителя подключить ко входу электронного осциллографа несимметрично.

4. Переключатель «постоянная времени» поставить в положение 0,1 с.

5. Установить на усилителе усиление, близкое к минимальному.

6. Включить приборы и после 3-минутного прогрева получить на экране осциллографа устойчивое изображение синусоидальной кривой с размахом 3—4 см.

7. Для положения переключателя «полоса сверху» — 5 кГц, меняя частоту генератора от 20 Гц до 10 кГц, снять частотную характеристику усилителя при $U_{вых} = \text{const}$.

8. Подсоединить клеммы «светолучевой гальванометр» усилителя к одному из каналов шлейфового осциллографа (тип гальванометра задается преподавателем).

9. Подать напряжение с выхода усилителя на гальванометр и, меняя усиление, получить на экране изображение сигнала с размахом 1 см.

10. При положении переключателя «полоса сверху» 5 кГц снять частотную характеристику шлейфа.

11. Определив по экспериментальным частотным характеристикам $f_{в}$, вычислить искажения, которым в обоих случаях подвергнутся компоненты (передний и задний фронты) нервного импульса. Исходное

время нарастания переднего фронта $t_n = 200$ мкс, заднего — $t_o = 800$ мкс, что соответствует крутизне 500 и 125 В/с.

12. Изобразив на рисунке оба импульса в масштабе, пояснить, чем и почему они будут отличаться при регистрации на электронном и шлейфовом осциллографах.

II. 1. Установить на звуковом генераторе $U_{вых} = 10$ мВ, $f = 500$ Гц.

2. При полной полосе пропускания усилителя измерить напряжение на его выходе при противофазном подключении сигнала.

3. Подав сигнал синфазно и регулируя его амплитуду на генераторе, добиться получения на выходе той же амплитуды, что и в 1-м случае.

4. Вычислить по полученным данным коэффициент дискриминации $K_d = U_{син}/U_{пр}$.

III. 1. Переключатель «постоянная времени» УБП2-03 поставить в положение 0,1 с.

2. Отключив генератор, подключить к входным клеммам усилителя сопротивление $R = 100$ кОм (оно примерно соответствует внутреннему сопротивлению ряда биологических объектов при макроэлектродных отведениях).

3. Установить на усилителе максимальное усиление, а переключатель «полоса сверху» поставить в положение 5 кГц. Меняя усиление на электронном осциллографе, установить на экране изображение шумов с размахом 1,5—2 см.

4. С помощью калибровочного устройства усилителя измерить напряжение шума (от пика до пика) для всех положений переключателя «полоса сверху».

Задача 3. Расчет и конструирование однокаскадного дифференциального усилителя

Цель работы. Углубить практические навыки работы с электронными приборами.

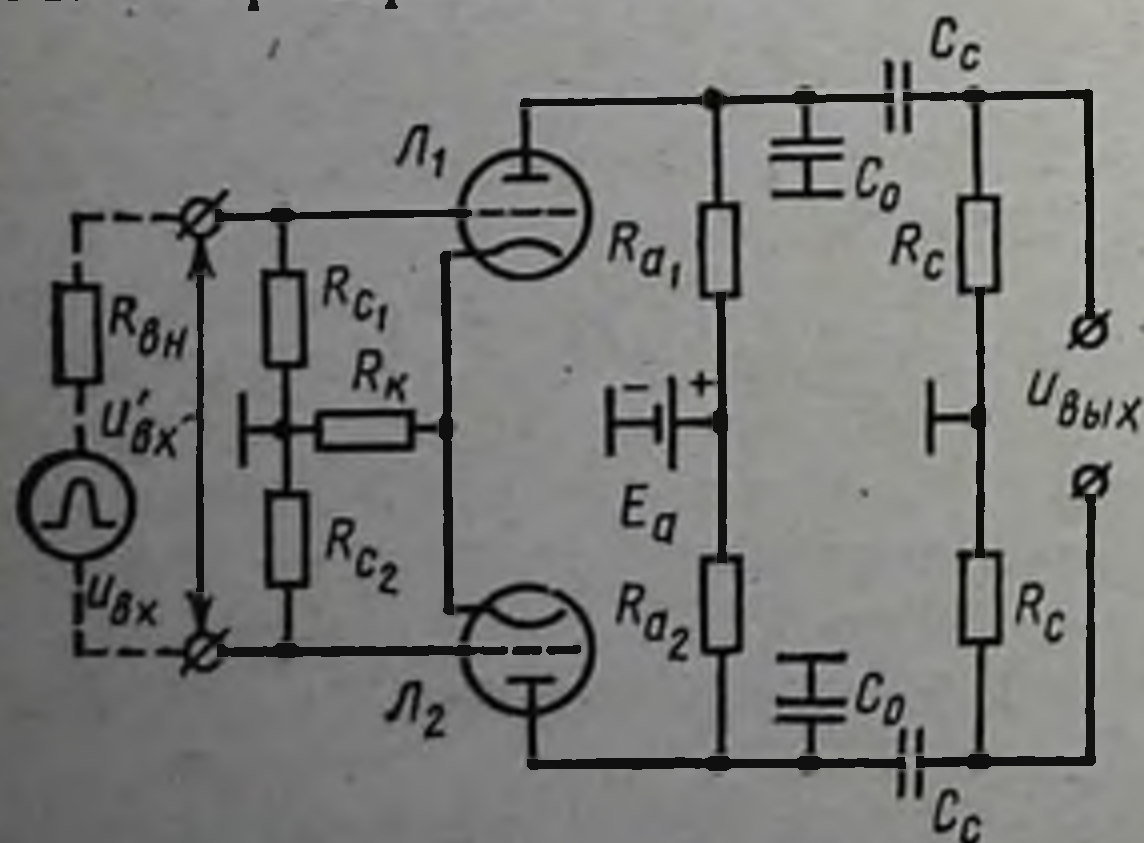


Рис. 41. Схема однокаскадного дифференциального усилителя

Методика. Рассчитывают предлагаемую схему дифференциального усилителя (рис. 41): определяют параметры и элементы схемы, определяющие режим работы ламп; коэффициент усиления каскада; верхнюю и нижнюю границы частотной характеристики или по заданным граничным частотам рассчитывают параметры и элементы схемы, определяющие ход частотной характеристики (вариант расчета определя-

ется преподавателем); входное сопротивление усилителя. Собирают рассчитанную схему и, подключив к испытательной установке, снимают частотную характеристику усилителя. Экспериментально определяют коэффициент усиления усилителя, сравнивая его с расчетным.

Ход расчета. Схема усилителя дифференциальная, симметричная. Расчет производят для одной (например, верхней) половины, за исключением сопротивления R_k , которое является общим для обоих плеч и рассчитывается с учетом суммарного тока двух ламп.

1. Определение режима работы ламп произвести графически по заданным значениям E_a , R_a и $U_{вх}$. При этом используются готовые

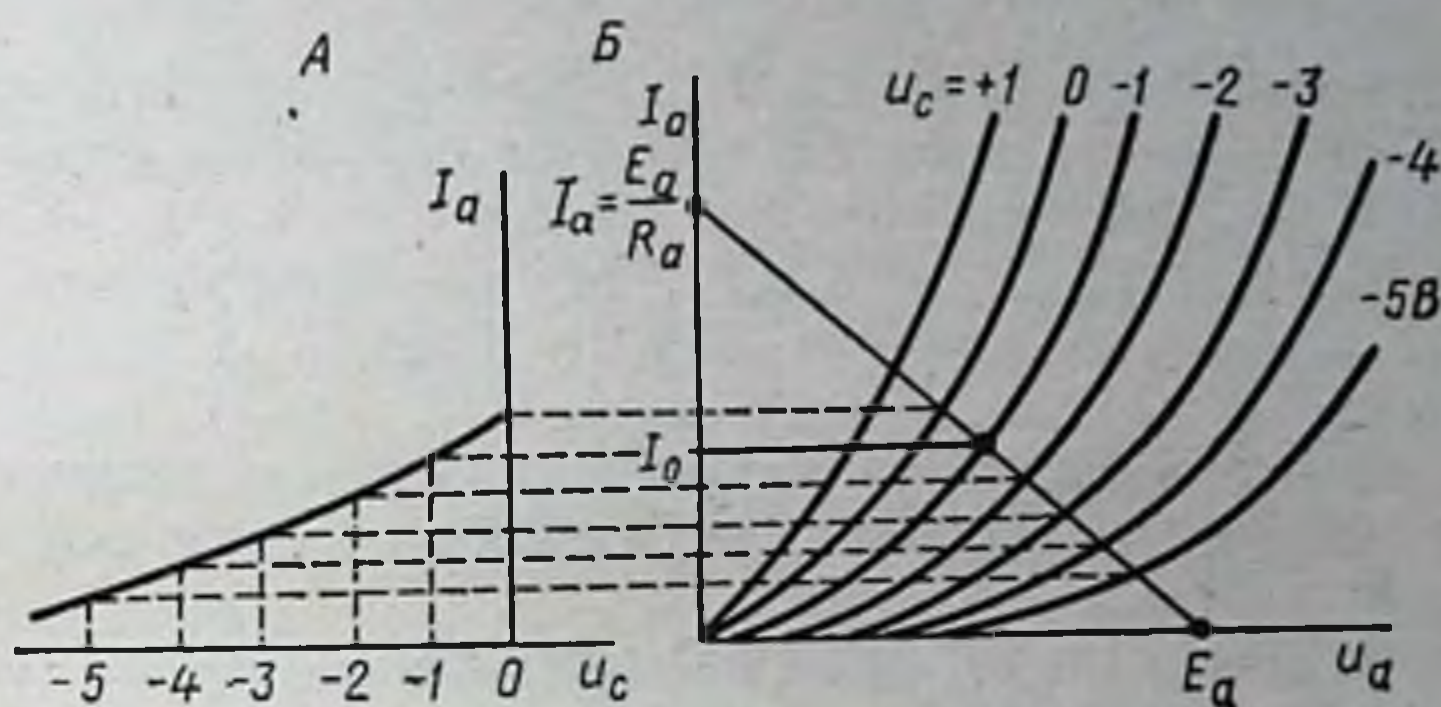


Рис. 42. К графическому расчету режимов и параметров лампы усилительного каскада

вольтамперные (анодные) характеристики лампы, которые перечерчиваются на мелко разграфленную бумагу в увеличенном масштабе.

В выбранной системе координат построить нагрузочную прямую. Ее пересечение с выбранной вольтамперной характеристикой даст значение анодного тока I_0 , определяющего рабочую точку (рис. 42, Б).

Произвести перенос (по точкам) нагрузочной прямой в систему анодно-сеточных координат $I_a = F(U_c)$. По полученным точкам построить динамическую характеристику (рис. 42, А). Выбор рабочей точки произвести исходя из следующих соображений. Если на вход устройства, имеющего нелинейную характеристику, подводится некоторое напряжение, например синусоидальное, то на выходе оно может быть искажено по форме (рис. 43, кривая а). Поэтому для данного диапазона усиливаемых напряжений необходимо выбирать достаточно линейный участок (рис. 43, кривая б).

С другой стороны, условием получения максимального коэффициента усиления каскада является работа лампы на участке с наибольшей крутизной. Не всегда представляется возможным соблюсти оба условия. Поэтому при выборе рабочей точки необходимо исходить из индивидуаль-

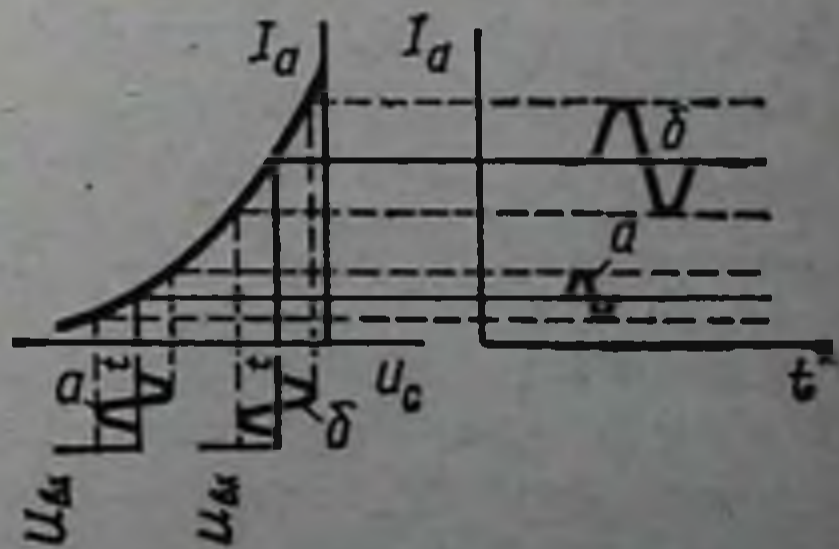


Рис. 43. К выбору рабочего участка на динамической характеристике лампы

ного задания. Если заданы сравнительно большие амплитуды входных (усиливаемых) напряжений, то необходимо руководствоваться первым условием, при малых значениях $U_{вх}$ — вторым.

Определив рабочую точку, т. е. выбрав определенное значение напряжения смещения $U_{см}$ и осуществив перенос этой точки в систему анодных координат, определить значение тока I_0 . Сопротивление R_k , определяющее величину выбранного автоматического смещения $U_{см}$, рассчитать с учетом действия удвоенного значения тока I_0 , так как R_k является общим для двух ламп. $R_k = |U_{см}|/2I_0$.

2. В рабочей точке определить R_i — внутреннее сопротивление лампы: $R_i = \Delta U_a / \Delta I_a$.

3. Для определения коэффициента усиления построить эквивалентную схему каскада (см. рис. 22) для средних частот (сопротивление C_c мало, а C_0 — велико).

$U_{вых} = \mu U_{вх} R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$, где μ — коэффициент усиления лампы, а $R_{общ} = R_a R_c (R_a + R_c)^{-1}$. Тогда $K = U_{вых} / U_{вх} = \mu R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$.

Расчет частотной характеристики производить по заданным R_c , C_c , C_0 или, наоборот, эти величины определить по заданным значениям граничных частот.

В области низких частот эквивалентная схема упрощается (емкость C_0 заменяется разрывом).

По методу эквивалентного генератора $U_{эп} = \mu U_{вх} R_a (R_i + R_a)^{-1}$, $R_{эп} = R_a R_i (R_a + R_i)^{-1}$, где $U_{эп}$ и $R_{эп}$ — напряжение и внутреннее сопротивление эквивалентного источника на низких частотах. Усилитель на низких частотах ведет себя как дифференцирующая цепь с постоянной времени $\tau_n = C_c (R_{эп} + R_c)$. Нижнюю граничную частоту определить из соотношения $f_n = (2\pi\tau_n)^{-1}$.

5. Для высших частот по методу эквивалентного генератора получим $U_{эв} = \mu U_{вх} R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$ и $R_{эв} = R_i R_{общ} (R_i + R_{общ})^{-1}$, где $U_{эв}$ и $R_{эв}$ — напряжение и внутреннее сопротивление эквивалентного источника на высоких частотах. Усилитель на этих частотах ведет себя как интегрирующая цепь с постоянной времени $\tau_v = R_{эв} C_0$. Верхняя граничная частота усилителя $f_v = (2\pi\tau_v)^{-1}$.

6. Входное сопротивление дифференциального усилителя (сопротивление между входными клеммами) $R_{вх} = R_{c1} + R_{c2}$. Для расчета необходимо знать внутреннее сопротивление источника входного напряжения $R_{вн}$ (например, внутреннее сопротивление биологического объекта исследования), а также допустимую величину потерь (в процентах) на этом сопротивлении.

7. Произвести испытание собранного усилителя следующим образом.

На вход усилителя y подать напряжение от звукового генератора, регулируемое по частоте и амплитуде. Выход усилителя подключить ко входу осциллографа (усилитель питается от стабилизатора выпрямителя, имеющего низковольтный (6,3 В) и высоковольтный (20—400 В) выходы, например УИП-2).

ТЕМА II. УСИЛИТЕЛИ ПОСТОЯННОГО ТОКА ДЛЯ МИКРОЭЛЕКТРОДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При микроэлектродных отведениях биопотенциалов особые требования предъявляют к входным каскадам усилителей. Применение очень тонких микроэлектродов с сопротивлением до $10^7 \div 10^9$ Ом вынуждает иметь входное сопротивление таких каскадов не менее $10^9 \div 10^{11}$ Ом. Важным требованием является минимальная величина сеточного тока лампы или тока управления транзистора входного каскада. Этот ток, протекая во входной цепи, может оказывать неблагоприятное воздействие на мембрану клетки, а также искажать результат измерений. В основном входные токи не должны превышать значения 10^{-11} А, а для мелких клеток — 10^{-12} А.

Чувствительность усилителей для микроэлектродных исследований ограничивается шумами входных цепей (в основном микроэлектродов) и дрейфом нуля. В лучшем случае она оказывается порядка 50—100 мкВ/см. Диапазон амплитуд регистрируемых сигналов (динамический диапазон) — 50 мкВ—150 мВ. Полоса пропускания определяется спектром отводимых биопотенциалов и обычно простирается от 0 до 10—15 кГц. Однако применяемые в настоящее время усилители имеют и другие верхние предельные частоты, что зависит от системы коррекции частот, а также от сопротивлений микроэлектродов.

При использовании высокоомных стеклянных микроэлектродов возникает проблема неискаженной регистрации быстрых биоэлектрических процессов: сказывается влияние большой постоянной времени входной цепи $\tau_{вх} = R_{мкэ} C_{вх}$, где $R_{мкэ}$ — сопротивление микроэлектрода, $C_{вх}$ — входная емкость схемы. $C_{вх}$ является суммарной величиной, состоящей из монтажной емкости C_m , межэлектродных емкостей лампы $C_{ск}$ и $C_{ас}$, а также емкости $C_{мкэ}$, образовавшейся между микроэлектродом и индифферентной средой: $C_{вх} = C_m + C_{ск} + C_{ас} + C_{мкэ}$. Расширение полосы пропускания высших частот можно достичь путем уменьшения $\tau_{вх}$ интегрирующей цепи входа. Так как $R_{мкэ}$ определяется свойствами микроэлектрода (диаметр кончика, концентрация заполняющего раствора и др.), то уменьшение $\tau_{вх}$ можно произвести лишь за счет уменьшения влияния $C_{вх}$.

Это достигается, в частности, применением в качестве входного каскада катодного повторителя, где в результате действия 100%-ной отрицательной обратной связи происходит нейтрализация емкости $C_{ск}$, входящей в состав $C_{вх}$. При отсутствии отрицательной обратной связи величина тока, проходящего через емкость $C_{ск}$ при действии на входе напряжения сигнала, зависела бы только от $U_{сг}$. В катодном повторителе ток $I_{ск}$ уменьшается в результате действия встречных напряжения сигнала $U_{сг}$ и напряжения обратной связи $|U_{ос}| = U_{вых}$. Непосредственно к $C_{ск}$ оказывается приложенным напряжение $U_{ск} = U_{сг} - U_{вых} = U_{сг} - U_{сг}K = U_{сг}(1 - K)$. Ток $I_{ск}$ будет меньше в $(1 - K)$ раз, т. к. $K < 1$.

Например, если коэффициент усиления катодного повторителя $K = 0,9$, то $U_{ск} = 0,1 U_{сг}$, и ток $I_{ск}$ также уменьшится в 10 раз. Уменьшение тока, проходящего через емкость, равносильно увеличению емкостного сопротивления $\chi_{C_{ск}}$, величина которого определяется как $\chi_C = 1/2\pi fC$. Применяя многосеточные лампы, а также более сложные схемы каскадных катодных повторителей, добиваются практической нейтрализации емкости сетка—анод $C_{ас}$. Некомпенсируемая часть входной емкости $C_{вх} = C_{мкэ} + C_m$ (минимальные значения составляют примерно 2—5 пФ) определяет f_v полосы пропускания усилителя и время установления переходной характеристики.

При достаточно высоких требованиях к форме и амплитуде быстрых компонентов биоэлектрических сигналов измерения с применением катодных повторителей возможны, если применять микроэлектроды с сопротивлением до 10—20 МОм. Так как в экспериментах в большинстве случаев используют очень тонкие микроэлектроды (с сопротивлением до 10^8 Ом и более), то необходимо уменьшать входную емкость усилителя до десятых долей пикофарады. Это достигается, в частности, применением в усилителях коррекции частотной характеристики цепями частотно-зависимой отрицательной обратной связи (рис. 44). За счет введения сравнительно большого R_k ($\sim 0,3 \div 0,5 R_a$) в каскаде создают отрицательную обратную связь, что приводит к снижению коэффициента усиления.

ния каскада на всех частотах. Емкость, шунтирующую R_k , выбирают из расчета ослабления отрицательной обратной связи только на высших частотах полосы пропускания, увеличивая, тем самым, коэффициент усиления в области высших частот.

Естественно, что применение частотно-зависимой отрицательной обратной связи, приводящее к подъему характеристики в области высших частот, приво-

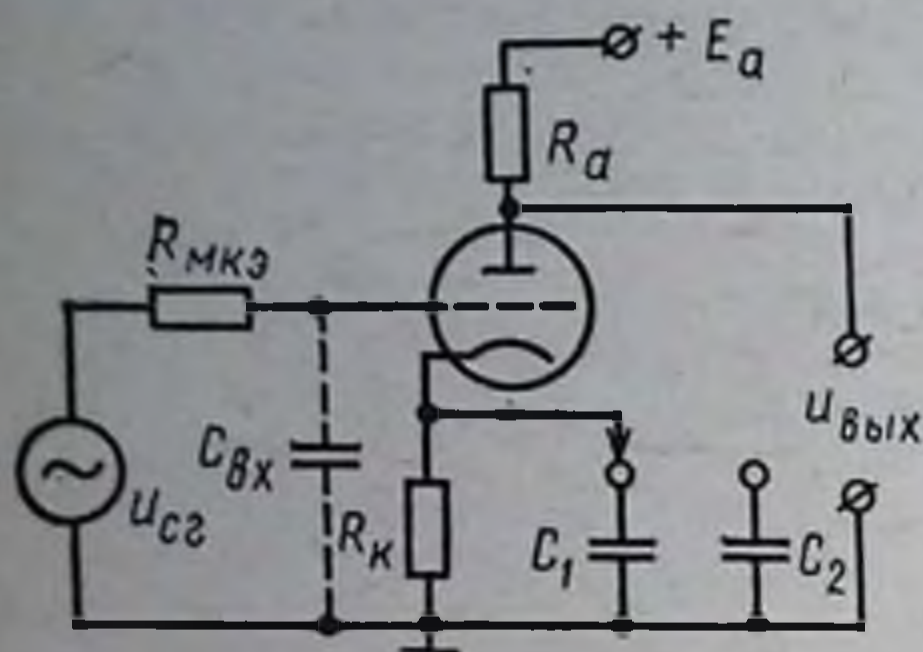


Рис. 44. Схема усилителя с коррекцией на высших частотах

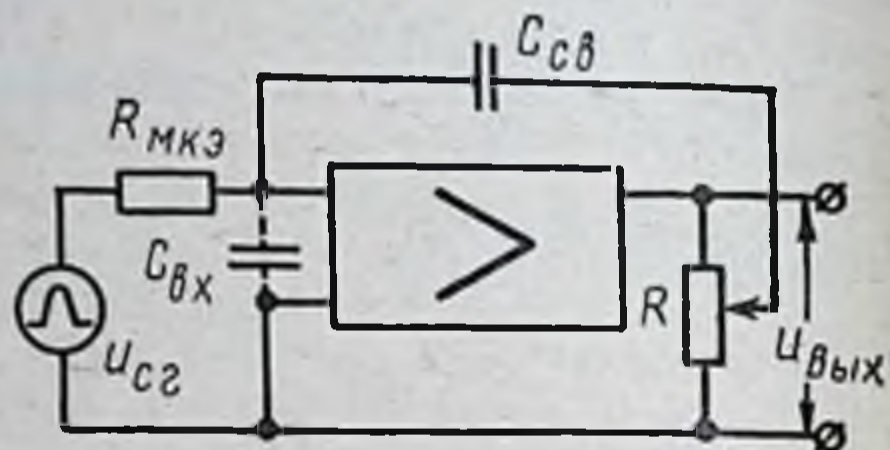


Рис. 45. К принципу работы усилителя с компенсацией входной емкости

дит к соответствующей коррекции времени установления t_y переходной характеристики. Это, в свою очередь, эквивалентно уменьшению постоянной времени входной цепи усилителя.

В широко применяемых схемах с отрицательной емкостью (рис. 45) компенсация входной емкости достигается путем увеличения коэффициента усиления на высших частотах, при введении во входную цепь частотно-зависимой положительной обратной связи через малую емкость $C_{св}$. Это избирательное повышение усиления компенсирует действие входной емкости на высших частотах. Однако недостатком таких схем является их нестабильность в работе, склонность к самовозбуждению при достаточно большой глубине обратной связи.

Рекомендуемая литература: [17; 21; 31].

З а д а ч а. Определение параметров усилителей постоянного тока (УПТ), предназначенных для микроэлектродных исследований

Цель работы. Изучить работу УПТ и определить некоторые их параметры. Научиться оценивать характер и степень влияния этих параметров на регистрацию биоэлектрической активности.

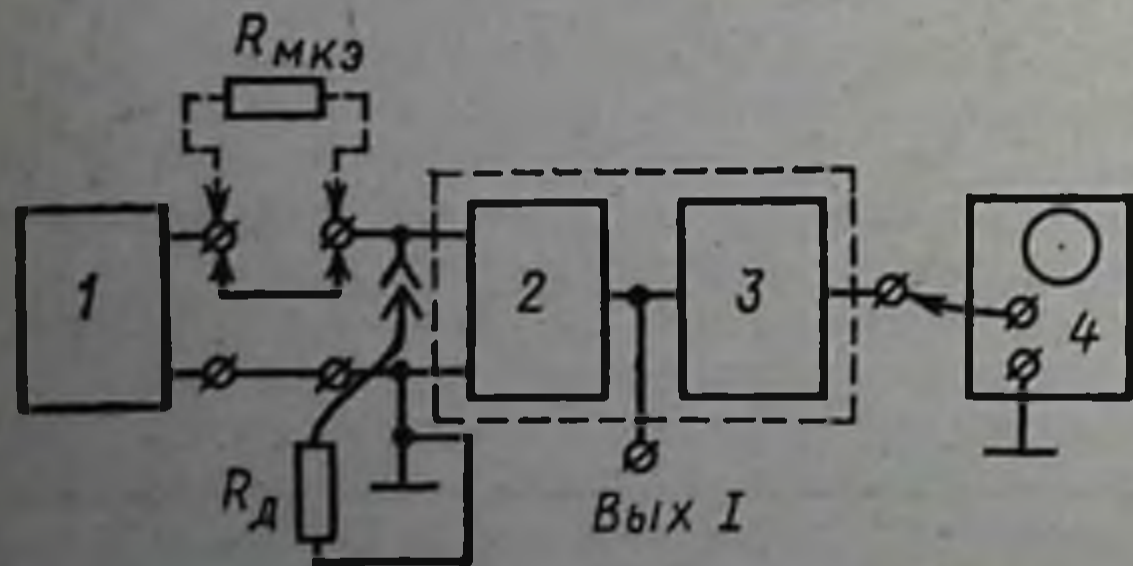


Рис. 46. Структурная схема установки для микроэлектродных исследований:
1 — ЭСЛ-2, 2 — источниковый повторитель, 3 — УПТ, 4 — СИ-19

Методика. В измерительную установку включить: транзисторный усилитель для микроэлектродных исследований, осциллограф СИ-19, стимулятор ЭСЛ-2. Структурная схема соединения приборов представлена на рис. 46.

Определяют коэффициент усиления источникового повтори-

теля (входного каскада усилителя) (I); измеряют входные токи истокового повторителя (II); измеряют сопротивление, имитирующее сопротивление микроэлектрода $R_{мкэ}$, (III); измеряют величину входной емкости усилителя $C_{вх}$ (IV); снимают переходные характеристики усилителя при введении частотной коррекции (V).

Ход работы. I. 1. Подключить вход усилителя к выходным клеммам стимулятора.

2. Установить напряжение на выходе стимулятора $U_{ст} = 100$ мВ, длительность импульса 10 мс и частоту 50—80 Гц.

3. Подключить вход осциллографа к клемме «выход I».

4. Включить приборы; после трехминутного прогрева и установки нулевого уровня на экране осциллографа измерить напряжение на выходе истокового повторителя с помощью калибровочного устройства осциллографа.

5. Вычислить $K = U_{вых}/U_{вх}$.

II. 1. Выключить стимулятор и, отключив входные клеммы истокового повторителя, замкнуть их накоротко. При этом на выходе усилителя произойдет скачок напряжения, связанный с изменением напряжения на входе: $\Delta U_{вх} = \Delta U_{вых}/K$.

2. По известному сопротивлению $R_{вх}$, вычислить входной ток $I_{вх} = \Delta U_{вх}/R_{вх}$.

III. 1. Подключить сопротивление $R_{мкэ}$ непосредственно к входной клемме истокового повторителя (не применяя удлинительных проводов). Второй конец сопротивления подсоединить к выходной клемме стимулятора.

2. Установить на стимуляторе $U_{ст} = 100$ мВ, $t_{п} = 100$ мс, $F = 3—5$ имп/с.

3. Включив приборы, после трехминутного прогрева измерить напряжение U_1 на выходе истокового повторителя.

4. Подключив параллельно входным клеммам добавочное сопротивление R_d , соизмеримое с $R_{мкэ}$, произвести измерение напряжения на выходе U_2 .

5. Рассчитать величину сопротивления $R_{мкэ}$: $R_{мкэ} = R_d(U_1/U_2 - 1)$.

IV. 1. Установить на стимуляторе $t_{п} = 0,5$ мс, $F = 500—600$ имп/с, $U_c = 0,1$ В, $R_{мкэ}$ — включено, R_d — выключено.

2. Получить на экране осциллографа, используя ждущую развертку, устойчивое изображение переходной характеристики.

3. Включив метки времени на осциллографе, измерить величину $\tau_{вх}$ или t_y и рассчитать по ним $C_{вх} = \tau_{вх}/R_{мкэ} = t_y/2,2 R_{мкэ}$.

V. 1. Вход осциллографа С1-19 подключить к клеммам «выход II».

2. Поставить на усилителе ручку «коррекция» в положение I и, соблюдая условия пункта IV, получить переходную характеристику и вычислить $\tau_{вх1}$.

3. Для положения 2 ручки «коррекция» повторить операции и вычислить $\tau_{вх2}$.

Обработка результатов. Сравнивают полученные значения $\tau_{вх}$, $\tau_{вх1}$, $\tau_{вх2}$. Вычисляют и сравнивают для них искажения переднего фронта нервного импульса с крутизной нарастания 500 В/с и амплитудой 100 мВ.

ТЕМА III. ЭЛЕКТРОННЫЕ ОСЦИЛЛОГРАФЫ

Электронные осциллографы применяют для наблюдения и регистрации как периодических, так и однократных электрических процессов. Основным элементом электронного осциллографа — электронно-лучевая трубка. Возможность наблюдать на экране осциллографической трубки различные по скорости электрические процессы делает ее незаменимой для многих исследований.

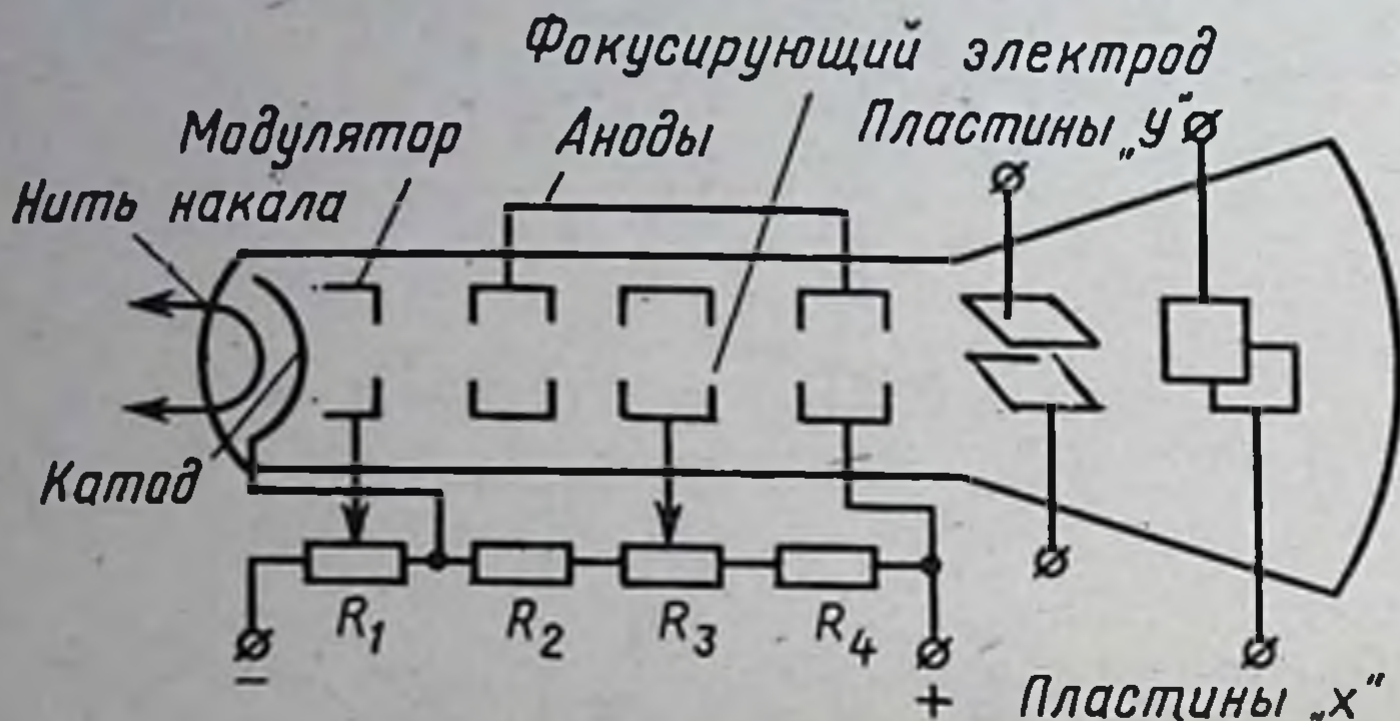


Рис. 47. Схема электронно-лучевой трубки

Электронно-лучевая трубка (рис. 47) состоит из системы электродов (электростатические линзы), системы отклоняющих пластин и экрана, покрытого люминесцирующим составом и служащего для преобразования энергии падающих на него электронов в световую энергию. Источником электронов служит накаленный катод. Электроды выполнены в виде цилиндров с отверстиями для прохода пучка электронов. Электроны, излучаемые катодом, под действием положительного (относительно катода) напряжения анодов движутся к ним. Часть электронов под действием ускоряющего поля анодов, пройдя через отверстия в электродах и через систему отклоняющих пластин, попадает на экран. От ударов электронов на экране возникает светящееся пятно. Изменением напряжения на фокусирующем электроде добиваются максимальной фокусировки этого пятна. На модулирующий электрод (модулятор) относительно катода подается небольшое отрицательное напряжение. Меняя его величину, можно регулировать величину электронного потока, а следовательно, и яркость светящегося пятна на экране вплоть до его полного исчезновения.

На сфокусированный электронный луч воздействуют системы пластин вертикального (y -пластины) и горизонтального (x -пластины) отклонения. На пластины y подается исследуемый сигнал, который отклоняет электронный луч в вертикальной плоскости. При этом может регистрироваться (или наблюдаться) только амплитуда или размах исследуемого напряжения. Для того чтобы развернуть этот процесс во времени, на горизонтально отклоняющие пластины подают импульс пилообразного напряжения. Линейно нарастающая во времени часть импульса (напряжение развертки) обеспечивает перемещение луча в горизонтальном направлении, а практически мгновенный спад этого напряжения (от $U_{\max}$ до 0) возвращает луч в исходное положение. Для осуществления непрерывно действующей временной развертки на пластины подают постоянно действующее пилообразное напряжение.

Скорость прохождения луча по экрану определяется периодом этого напряжения. Согласование во времени исследуемого сигнала и временной развертки (синхронизация) будет достигнуто, если частота развертки равна или в целое число раз меньше частоты исследуемого сигнала. При этом на экране получается

неподвижное изображение n -периодов исследуемого сигнала, где n — отношение частот сигнала и развертки.

Так как чувствительность электронно-лучевых трубок невелика ($\sim 0,1 - 0,5$ мм/В), для увеличения сигнала, подводимого к пластинам трубки, в схему осциллографа вводят усилители (по осям x и y) (рис. 48). Коэффициент усиления большинства осциллографических усилителей варьирует от нескольких сотен до

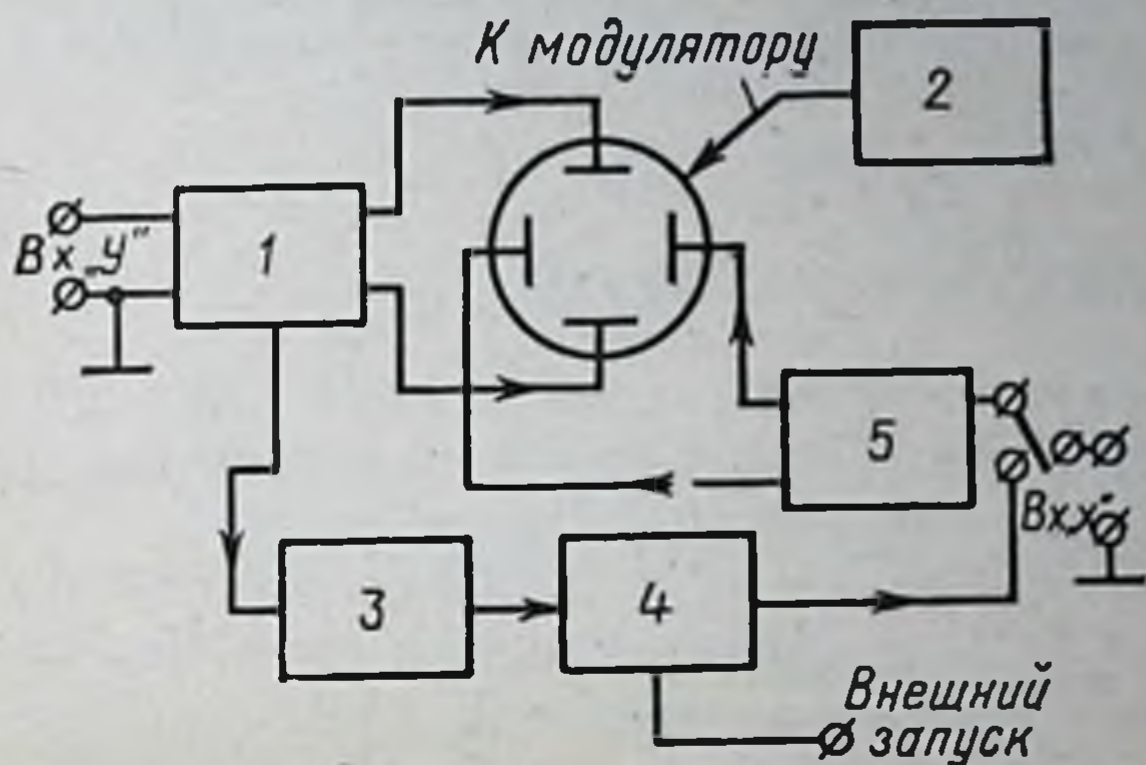


Рис. 48. Структурная схема простейшего осциллографа:

1 — усилитель « y », 2 — генератор меток времени, 3 — усилитель синхронизации, 4 — генератор развертки, 5 — усилитель « x »

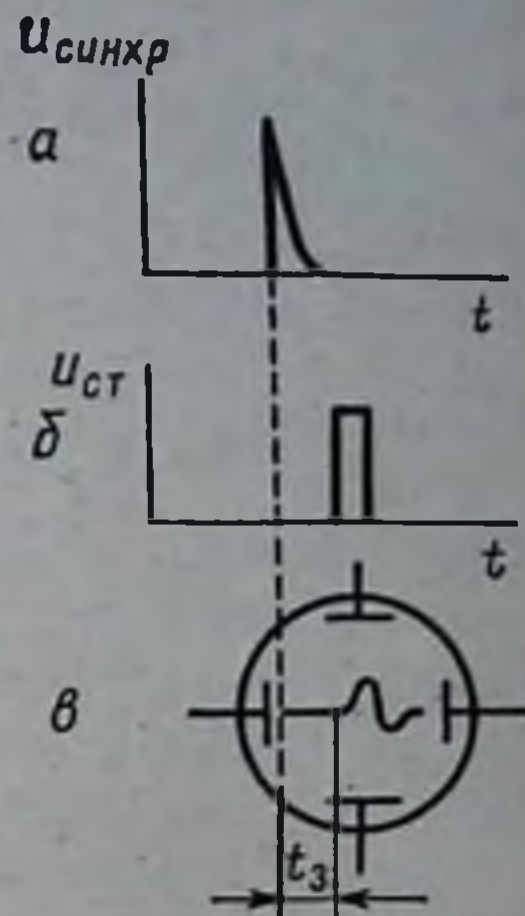


Рис. 49. Пример запуска развертки внешним запускающим импульсом

нескольких тысяч, а полоса пропускания — от нуля до нескольких сотен килогерц (усилители постоянного напряжения) или от нескольких герц до единиц и десятков мегагерц (усилители переменного напряжения).

Третий вход осциллографа («ось z ») предназначен для управления яркостью свечения различных частей изображения, создаваемого лучом на экране. Например, модуляцию яркости луча используют для нанесения меток времени. Для этого в схеме предусмотрен генератор меток времени, подающий на модулирующий электрод кратковременные периодически повторяющиеся импульсы. При этом линия, прочерчиваемая лучом, оказывается испещренной рядом светящихся черточек, если импульсы имеют положительную полярность, или пропусков при обратной полярности этих импульсов. Длительность исследуемого процесса определяется отношением $t = nT = n/F$, где n — число меток, T и F — период и частота импульсов меток времени. Например, если частота повторений импульсов $F = 1$ кГц, то расстояние между метками (цена метки) будет равно 1 мс.

В осциллографах предусмотрена возможность при отключении от входа усилителя x генератора развертки изучать зависимости двух процессов, один из которых подается на вход y , другой — на вход x . Если к отклоняющим пластинам подводят переменные напряжения, различные по амплитуде, частоте и фазе, то на экране возникают так называемые фигуры Лиссажу. Вид этих фигур зависит от формы напряжений и от соотношения между их частотами, амплитудами и фазами, что используют для измерения частот и фазовых сдвигов. Этот метод применяют в векторкардиографии.

Для получения на экране неподвижного изображения сигнала в осциллографах генератор развертки синхронизируется исследуемым напряжением. Для этого обычно через так называемый «усилитель синхронизации» часть усиленного напряжения сигнала с выхода усилителя « y » подается в схему генератора развертки. При исследовании непериодических процессов применяют ждущую или однократную развертку, однократный цикл которой запускается внешним сигналом («внешний запуск»). Это бывает особенно удобно, когда запускающий

развертку импульс связан по времени с источником сигнала. Так, например, в электрофизиологических электростимуляторах с двух отдельных выходов получают два импульса, идущие с одной частотой, но сдвинутые во времени (рис. 49). Первый (а) запускает ждущую развертку, а второй (б) производит стимуляцию физиологического объекта, ответную реакцию которого регистрируют на экране (в). Меняя время задержки t_3 , экспериментатор имеет возможность устанавливать изображение сигнала в любой части экрана. Весьма часто запуск ждущей развертки производят исследуемым сигналом («внутренний запуск»). Для надежной регистрации исследуемого сигнала генератор развертки должен включаться на некоторое время t_3 раньше его поступления в электронно-лучевую трубку. С этой целью он подается на y -пластины через специальную цепь — «линию задержки».

Рекомендуемая литература: [10; 21].

З а д а ч а. Электронный осциллограф

Цель работы. Изучить принципы работы электронных осциллографов на примере типового прибора С1-69. Освоить измерительные устройства осциллографа. Изучить виды разверток прибора.

Методика. При выполнении работы на вход осциллографа С1-69 подают сигналы стимулятора ЭСЛ-2. Экспериментально изучают работу блоков развертки и калибровочных (измерительных) устройств осциллографа.

Ход работы. 1. Выход стимулятора подсоединить ко входу одного из каналов осциллографа.

2. Установить на стимуляторе следующие режимы: частота 40—50 Гц, длительность 8—10 мс.

3. Включить приборы и после 5-минутного прогрева, произведя регулировку яркости и фокусировки электронного луча осциллографа, приступить к измерениям.

4. Произвести синхронизацию поступающих на вход сигналов с помощью: *внешней синхронизации* (с подачей синхроимпульса от ЭСЛ-2) при работе развертки в автоколебательном режиме (периодическая развертка); *внутренней синхронизации* (исследуемым сигналом) при работе развертки в ждущем режиме; *внешней синхронизации с запуском от импульса задержки стимулятора ЭСЛ-2; в ждущем режиме* — произвести однократный запуск развертки с блокировкой последующих запусков.

5. Измерить амплитуду усиливаемых сигналов двумя способами: методом сравнения и по калибровочной шкале.

6. Пользуясь указанным в инструкции прибора методом измерения временных интервалов, определить длительность импульсов для произвольных положений ручки «длительность плавно», расположенной на панели стимулятора.

7. Произвольно меняя частоту на стимуляторе, произвести 2—3 измерения частоты, пользуясь методом, изложенным в описании к прибору.

Т Е М А IV. ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯТОРЫ

Малогабаритные лабораторные электростимуляторы строятся, как правило, по следующей функциональной схеме (рис. 50). В 1-м блоке, работающем в автоколебательном режиме и собранном, например, по схеме симметричного

мультивибратора, генерируются импульсы напряжения прямоугольной формы, перестраиваемой частоты. Современные электростимуляторы обычно имеют диапазон частот от 0,1 Гц до нескольких килогерц.

Передним фронтом каждого генерируемого импульса или внешним сигналом запускается первый ждущий мультивибратор, вырабатывающий в ответ свой прямоугольный импульс с регулируемой длительностью. На выходе 1-го ждущего мультивибратора этот импульс дифференцируется. Положительный

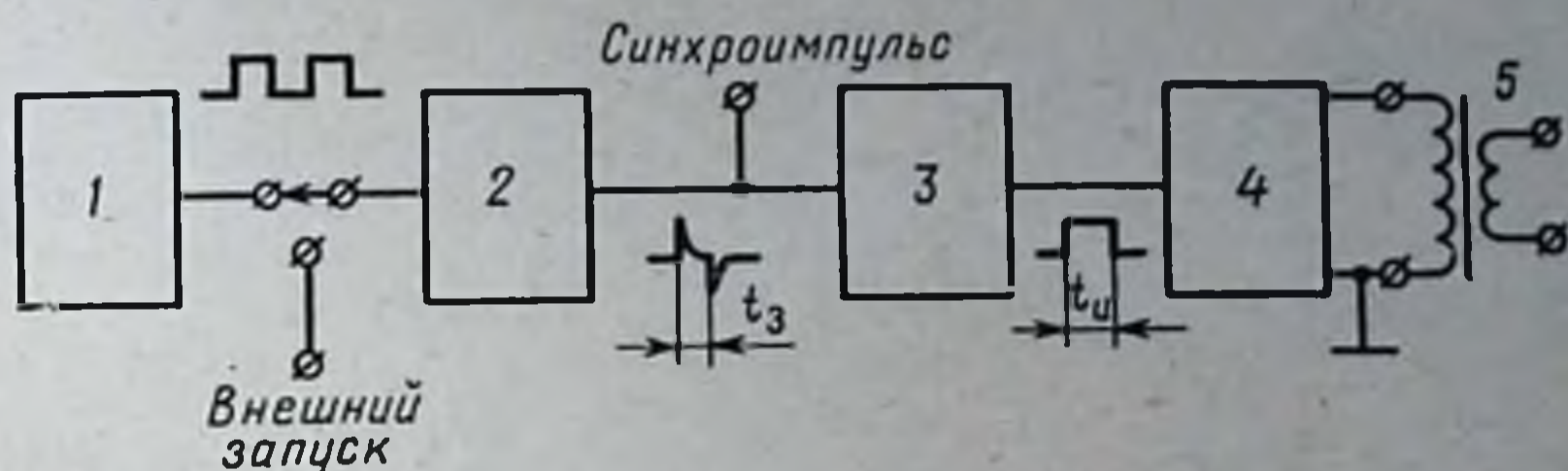


Рис. 50. Структурная схема стимулятора:

1 — симметричный мультивибратор, 2 — ждущий мультивибратор I, 3 — ждущий мультивибратор II, 4 — выходной каскад, 5 — импульсный трансформатор

импульс напряжения, так называемый синхроимпульс, служит для запуска развертки осциллографических устройств. Отрицательным импульсом напряжения запускается 2-й ждущий мультивибратор, также вырабатывающий на каждый проходящий импульс свой прямоугольный импульс с регулируемой (ступенчато и плавно) длительностью. Напряжение этих импульсов поступает на выходной каскад и далее на раздражающие электроды. Каждый импульс на выходе электростимулятора оказывается задержанным относительно синхроимпульса на некоторое время t_3 , которое связано с длительностью импульса первого ждущего мультивибратора. Диапазон длительностей импульсов электростимуляторов, от 0,01 мс до нескольких секунд.

Назначение выходного каскада — согласование выхода прибора, имеющего внутреннее сопротивление $R_{вн}$, с объектом стимуляции (биологический объект), характеризующимся $R_{об}$. При подаче импульсов электростимулятора на объект $U_{об} = U_{вых} R_{об} (R_{вн} + R_{об})^{-1} = U_{вых} (R_{вн} / R_{об} + 1)^{-1}$.

Например, если на шкале прибора установлено некоторое напряжение $U_{вых}$, а $R_{вн} = R_{об}$, то на объекте в точках стимуляции окажется только половина установленного напряжения. Для того чтобы $U_{об} \simeq U_{вых}$, необходимо,

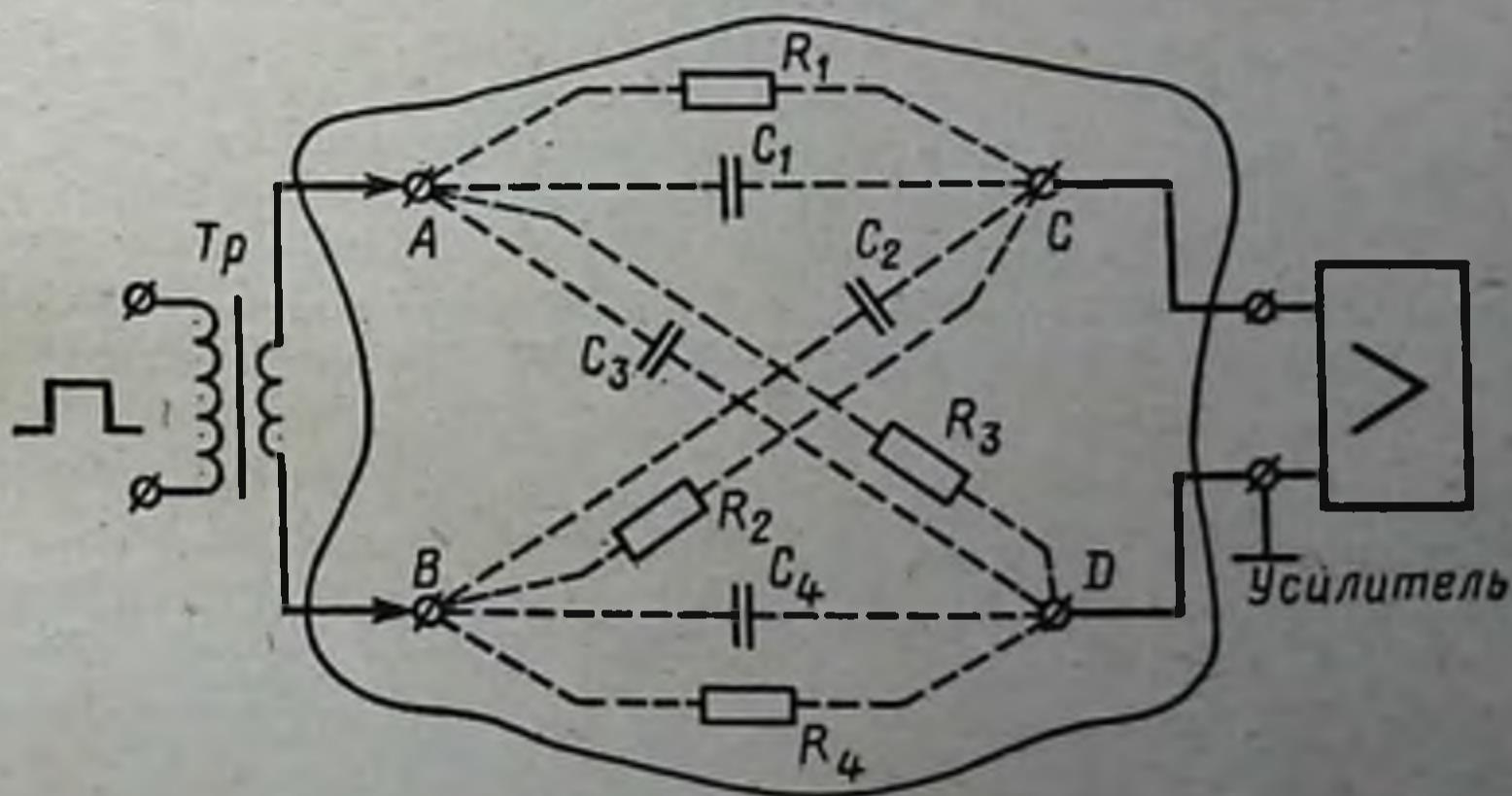


Рис. 51. К анализу электрических процессов при стимуляции физиологического объекта

чтобы отношение $R_{об}/R_{вн}$ было как можно больше. У экспериментатора нет возможности изменить $R_{об}$, но можно включить в схему каскад с достаточно низким $R_{вн}$. Таким каскадом является, например, катодный повторитель.

Однако в настоящее время в биологии основным стимулирующим фактором считается ток, а не напряжение. Поэтому в некоторых стимуляторах имеются так называемые выходы по току, где соблюдается условие $R_{вн} \gg R_{об}$. В этом случае стимулирующий ток в цепи не будет зависеть от изменений условий в звене электрод—объект.

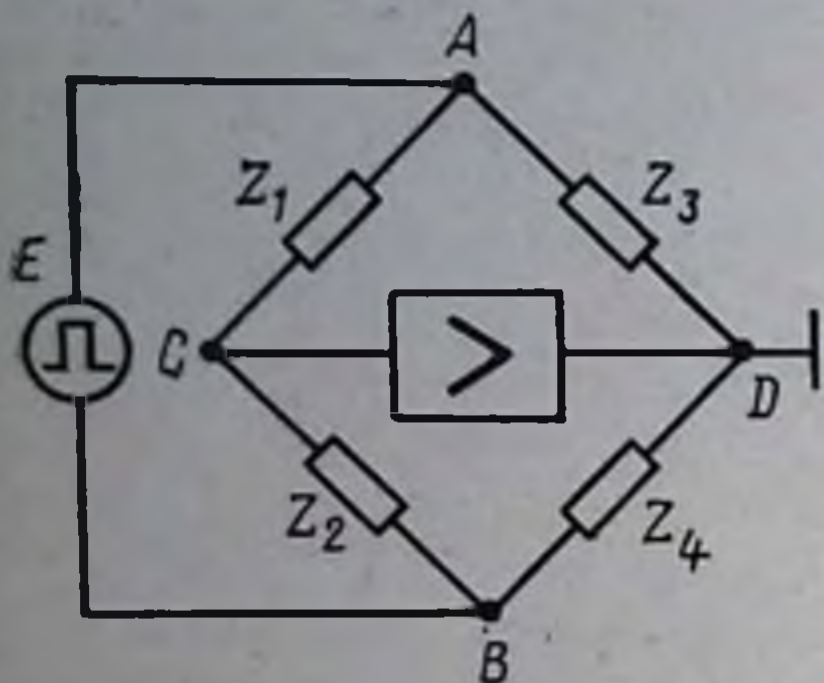


Рис. 52. Эквивалентная схема электрической цепи при стимуляции физиологического объекта

Изменение амплитуды импульсов электростимулятора осуществляется в выходном каскаде и производится в диапазоне от сотых долей вольт до нескольких десятков или сотен вольт. В целях уменьшения артефакта раздражения (наводка стимулирующих импульсов на отводящие электроды) напряжение со стимулятора подается на раздражающие электроды через импульсный трансформатор. На рис. 51 приведена схема стимуляции биологического объекта при одновременном отведении биопотенциалов. Точки A и B, куда приложено стимулирующее напряжение, несомненно имеют электрическую связь, например, через сопротивление ткани и паразитные емкости, с точками C и D, куда подведены отводящие электроды. Поэтому

разность потенциалов U_{CD} хотя и отличается от U_{AB} , но может достигать достаточно больших величин. В этом случае картина записи полезных сигналов (особенно с малой амплитудой) может быть полностью затемнена артефактами раздражения.

Представленную на рис. 51 систему можно заменить эквивалентной схемой, представляя каждую цепь комплексными сопротивлениями, в которой напряжение артефакта U_{CD} действует в диагонали мостовой схемы (рис. 52). Условие $U_{CD} = 0$ можно получить только при полном балансе моста, т. е. когда $Z_1 Z_4 = Z_2 Z_3$. Однако практически сбалансировать мост в процессе измерения изменением отношений импедансов плеч весьма трудно.

Второй путь уменьшения артефакта заключается в повышении импедансов плеч моста путем увеличения расстояния между раздражающими и отводящими электродами (увеличение R_1 и R_2), а также между проводами, идущими к стимулятору и усилителю (снижение C_1 и C_2). Применяя теорему об эквивалентном генераторе, всю систему можно свести к схеме (рис. 53), состоящей из источника U_{CD} , э. д. с. которого определяется степень разбаланса моста с внутренним сопротивлением $Z_{экв}$, определяемым импедансами его плеч. Чем больше $Z_{экв}$, тем меньше $U_{вх}$. В схеме $Z_{вх}$ — комплексное входное сопротивление усилителя. Из рис. 52 также видно, что если выход стимулятора одним концом, например через точку B, заземлен (несимметричный выход), то это равносильно закорачиванию одного из плеч (в данном случае BD) моста. Естественно, это приведет к резкому возрастанию U_{CD} . Поэтому в стимуляторах применяют специальные устройства (например, импульсный трансформатор), позволяющие отделить

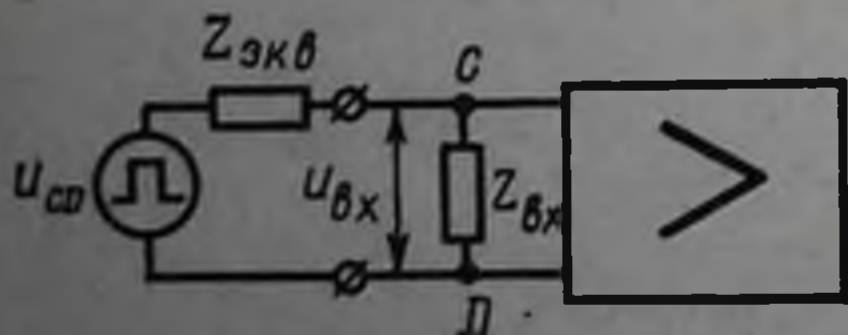


Рис. 53. Эквивалентная схема процесса стимуляции физиологического объекта

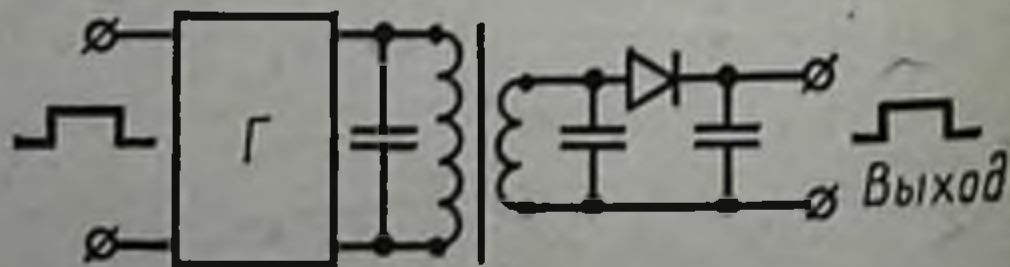


Рис. 54. Структурная схема радиочастотного выхода стимулятора

заземленный выход стимулятора от препарата. Импульсный трансформатор, однако, имеет много недостатков, в частности, искажает крутые фронты импульсов и практически непригоден для пропускания импульсов с большой длительностью. Кроме того, в силу своих конструктивных особенностей импульсный трансформатор имеет довольно большие емкости C_3 , C_4 по отношению к индифферентной среде, что способствует снижению импеданса моста.

Значительно лучшие результаты дает применение так называемых радиочастотных выходов (рис. 54). При поступлении импульсов от стимулятора на генератор происходит формирование импульсов напряжения с несущей частотой в несколько мегагерц, которые передаются во вторичную обмотку высокочастотного трансформатора. После детектирования импульсы подводятся к раздражающим электродам. Благодаря слабой связи вторичной обмотки с генератором выход такого устройства имеет очень малые емкости по отношению к индифферентной среде. Тем самым выполняются условия для уменьшения артефакта.

Рекомендуемая литература: [21; 50].

З а д а ч а. Изучение электростимуляторов

Цель работы. Изучить принципы работы электростимуляторов на примере типового прибора ЭСЛ-2 и приобрести навыки практической работы с такого рода приборами.

Методика. В структурную схему измерительной установки входят стимулятор ЭСЛ-2, осциллограф С1-1, генератор звуковых частот ГЗ-36А.

Проверяют градуировку шкалы частот стимулятора (I) и градуировку шкалы длительностей импульсов стимулятора (II); измеряют выходное сопротивление изолирующего трансформатора (III).

Ход работы. I. 1. Подключить выход стимулятора ко входу «у» осциллографа.

2. Подключить выход генератора ко входу «х» усилителя.

3. Выключить генератор развертки осциллографа.

4. Установить длительность стимулирующих импульсов 2—3 мс, амплитуду на выходе 5—10 В.

5. Устанавливая частоту следования импульсов на стимуляторе и меняя частоту синусоидального напряжения, получить на экране неподвижное изображение суммарного процесса для каждого значения частоты (диапазон частот задается преподавателем).

6. Сравнивая частоту стимулятора с эталонной частотой звукового генератора, вычислить разницу этих частот ΔF .

7. Сведя данные в таблицу, построить график $\Delta F = \varphi(F_{ст})$.

II. 1. Соединить выход синхроимпульса стимулятора со входом «внешняя синхронизация» осциллографа.

2. Подключить выход звукового генератора к модулятору осциллографа и добиться получения меток времени на экране. Временной интервал между метками численно равен периоду установленного на генераторе синусоидального напряжения.

3. Устанавливать частоту на стимуляторе в зависимости от диапазона измеряемых длительностей, т. е. соблюдая условие $t_n < T$.

4. Проградуировать заданную шкалу длительностей прямоугольных импульсов.

5. Сведя полученные данные в таблицу, построить график $\Delta t_n = \varphi(t_n)$, где Δt_n — разница между длительностью, указанной на шкале стимулятора t_n , и измеренной длительностью $t_{изм}$.

III 1. Подключить вход изолирующего трансформатора к выходу стимулятора, а выход трансформатора — ко входу осциллографа.

2. Установить на стимуляторе длительность 1 мс, частоту 50 Гц, амплитуду 10 В.

3. Меняя длительность от 1 до 10 мс, проследить изменение формы импульсов и зарисовать их при длительности 1 и 10 мс.

4. Измерить в линейных единицах (см) амплитуды импульсов U_1 .

5. Подключить параллельно входным клеммам трансформатора сопротивление 100 Ом и вновь произвести измерение (U_2).

6. Вычислить выходное сопротивление $R_{вых}$ изолирующего трансформатора.

7. Рассчитать, какая часть напряжения, установленного на стимуляторе, будет действовать на электродах, подведенных к мышце, если сопротивление стимулируемого участка (вместе с шунтирующей жидкостью) равно 300 Ом.

Раздел II

ФИЗИОЛОГИЯ НЕРВОВ И МЫШЦ И ОБЩАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

В этот раздел практикума, с которого начинается собственно большой практикум по физиологии животных, входят задачи, выполняемые на *возбудимых клетках* — нервных и мышечных. Функции этих клеток следующие: восприятие нервного возбуждения через синаптические структуры, собственное возбуждение, распространение возбуждения по клетке, передача возбуждения на соседние клетки через синаптический аппарат, сокращение. Эти процессы лежат в основе важнейших физиологических явлений в организме: управляющей и координирующей деятельности мозга и вегетативной нервной системы, работы двигательного аппарата сердца, желудочно-кишечного тракта и других органов.

Многообразие возбудимых клеток объединено общностью ряда основных свойств, благодаря чему закономерности, выявленные на каком-либо конкретном объекте, могут быть распространены на другие возбудимые клетки. Основные явления в физиологии возбудимых клеток — *возникновение и распространение возбуждения* — неразрывно связаны с электрическими процессами в клетке.

Изолированные из организма нервные и мышечные волокна могут длительное время сохранять свои свойства при условии смачивания их солевым раствором, по составу и осмотическому давлению близким к межклеточной жидкости соответствующего животного. Поэтому можно исследовать общие закономерности возбуждения, его распространения, синаптической передачи и сокращения на изолированных нервах и мышцах.

ТЕМА I. МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

С тех пор как был разработан микроэлектродный метод внутриклеточного отведения, позволивший регистрировать потенциал покоя одной клетки, практически не повреждая ее, на разных объектах были получены абсолютные величины потенциалов покоя.

Объект	Потенциал покоя, мВ
Портижная мышца лягушки	88
Нерв каракатицы	62
Мотонейроны млекопитающих	60—80

Основными потенциалобразующими ионами для большинства возбудимых клеток являются ионы K^+ , Na^+ и Cl^- (табл.).

Используя теорию постоянного поля Гольдмана, А. Ходжкин и Б. Катц предложили рассчитывать мембранный потенциал (МП), или потенциал покоя клетки, в помощью следующего уравнения:

$$V_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_n + P_{Na} [Na^+]_n + P_{Cl} [Cl^-]_в}{P_K [K^+]_в + P_{Na} [Na^+]_в + P_{Cl} [Cl^-]_н}, \quad (1)$$

где V_M — МП, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — число Фарадея, P — проницаемость для данного иона, $[K^+]_н$, $[Na^+]_н$, $[Cl^-]_н$ — концентрации соответствующих ионов снаружи клетки, а $[K^+]_в$, $[Na^+]_в$, $[Cl^-]_в$ — внутри.

**Таблица. Соотношение концентраций ионов внутри клеток
и в межклеточной жидкости**

Объект	Ионы	Концентрация, ммоль/л	
		внутри клетки	снаружи клетки
Гигантский аксон кальмара	K ⁺	369	13
	Na ⁺	44	460
	Cl ⁻	36	540
Мышца лягушки	K ⁺	125—140	2,5—6
	Na ⁺	15	110
	Cl ⁻	1,2	77
Нервная клетка кош- ки	K ⁺	150	5,5
	Na ⁺	15	150
	Cl ⁻	9	125

Помимо свойств мембраны и концентрационного градиента для проникающих ионов МП во многих случаях зависит от активности натрий-калиевого насоса. Насос электронейтрален, если натриевый поток наружу и калиевый — внутрь равны. Если калиевый поток внутрь меньше натриевого наружу, то МП клетки будет выше рассчитанного по уравнению (1), так как натрий-калиевый насос тоже будет создавать небольшой потенциал. Наиболее электрогенным насос будет в том случае, если он транспортирует наружу только входящие в клетку ионы Na⁺, не закачивая внутрь ионов K⁺. При этом МП соответствует калиевому равновесному потенциалу и описывается уравнением Нернста:

$$V_K = RT/F \ln [K^+]_н / [K^+]_в. \quad (2)$$

Близкая к этой ситуация наблюдается в портняжной мышце лягушки.

Чем выше проницаемость какого-либо из трех потенциалобразующих ионов, тем ближе МП к потенциалу равновесия для этого иона, рассчитываемому по формуле Нернста. В покое мембрана большинства возбудимых клеток наиболее проницаема для K⁺, поэтому потенциал покоя ближе всего к калиевому равновесному потенциалу.

Для мышечных клеток лягушки в условиях покоя ионы Cl⁻ распределяются пассивно в соответствии с величиной МП. В связи с этим для расчетов МП можно использовать упрощенное уравнение (1):

$$V_M = 58 \lg \frac{[K^+]_н + 0,013 [Na^+]_н}{[K^+]_в + 0,013 [Na^+]_в} \quad (3)$$

где натуральный логарифм переведен в десятичный, подсчитано RT/F для температуры 20 °С ($R = 8,313$ Дж, $F = 96\,494$ Кл) и определено соотношение проницаемостей для Na и K. $P_{Na}/P_K = 0,013$ в мышечных волокнах лягушки.

З а д а ч а. Исследование мембранного потенциала мышцы

Цель работы. Зарегистрировать МП ряда волокон портняжной мышцы лягушки методом внутриклеточного отведения. Исследовать зависимость МП от наружной концентрации ионов K⁺. Определить концентрацию K в контрольном растворе по величине регистрируемого МП.

Методика. Измерение МП мышечных волокон производят стеклянными микроэлектродами, с помощью лабораторного рН-метра, используемого как высокоомный милливольтметр. В работе используют

портняжную мышцу лягушки. На сухожилие у колена накладывают лигатуру, а у сращения бедренных костей лигатуру накладывают на самый конец мышцы. Выпрепарованную мышцу укрепляют в камере внутренней стороной вверх, слегка растянув ее. Камеру заполняют раствором Рингера для холоднокровных¹. На небольшом протяжении вскрывают оболочку мышцы, иначе кончик микроэлектрода при введении будет обламываться. Камеру укрепляют на стеклянном столике от настольной лупы, под биноклем.

Используют стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором 3М KCl² (диаметр кончика порядка 1—0,5 мкм). Способы изготовления и заполнения стеклянных микроэлектродов подробно описаны (см. №№ 13, 31 в списке рекомендуемой литературы). Электрод фиксируют специальным винтом в препаратоводителе, укрепленном на универсальном штативе над камерой для препарата. Препаратоводитель используют в качестве микроманипулятора для подведения микроэлектрода и его введения в клетку. К входному кабелю рН-метра припаяны два серебряных электрода, которые перед опытом хлорируют. Один из них погружают в раствор KCl широкой части микропипетки, другой опускают в раствор Рингера, заполняющий камеру с мышцей. Таким образом, для регистрации МП используют систему Ag—AgCl. Хлорирование проводят в 1%-ном растворе NaCl. Источником тока служит батарейка карманного фонарика (4,5 В), анодом — оба серебряных электрода одновременно, катодом — графитовый стержень. Для регулировки силы пропускаемого тока в цепь включен реостат. Положение ползунка реостата подбирают эмпирически так, чтобы за 2—3 с поверхность электрода была покрыта ровным белым слоем AgCl.

При измерении МП рН-метром типа ЛПУ-01 или ЛПУ-02 ручку «Виды работ» устанавливают в положение «рН». Переключатель «Пределы измерений» устанавливают в положение «2÷6 рН», тогда шкала соответствует напряжению от 0 до —400 мВ с ценой деления 5 мВ.

Так как измерения в обычном растворе Рингера и в опытных растворах с увеличенным количеством калия желательно выполнить на одной мышце, то до приготовления препарата рекомендуется рассчитать и приготовить все растворы. Каждая работающая группа готовит три раствора: два опытных с увеличенным количеством К и изотонический раствор калия (140 ммоль/л K⁺).

В состав 1 л обычного раствора Рингера для холоднокровных входит: NaCl — 111 ммоль, KCl — 2, CaCl₂ — 1,2 и NaHCO₃ — 2 ммоль. Опытные растворы необходимо приготовить с таким же осмотическим давлением, как и в растворе Рингера, но с увеличенным в

¹ Здесь и далее см. «Общие указания к выполнению и оформлению задач».

² При концентрации раствора KCl 3 моль/л сопротивление микроэлектрода составляет 10—30 МОм. В случае использования изотонического KCl сопротивление было бы 50—150 МОм. В большинстве работ для заполнения микроэлектродов используют именно KCl в связи с тем, что подвижности ионов K⁺ и Cl⁻ очень близки; это уменьшает собственный диффузионный потенциал микроэлектродов.

разное число раз количеством K^+ . Для растворов электролитов осмотическое давление можно подсчитать по формуле $p = iCRT$, где p — осмотическое давление, C — молярная концентрация, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, $i = 1 + (m - 1)\alpha$ (m — число ионов, на которое диссоциирует молекула электролита, α — степень диссоциации, ее значение берут из химического справочника). Когда выравнивают осмотическое давление обычного раствора Рингера и опытного раствора, произведение RT будет одинаковым для обеих частей уравнения и сократится, поэтому можно подсчитывать только произведение iC для каждого раствора.

Содержание K увеличивают за счет уменьшения такого же количества Na . Поэтому удобнее считать iC только для $NaCl$ и KCl , а $CaCl_2$ и $NaHCO_3$ добавлять в опытный раствор в таком же количестве, как и в обычный раствор Рингера. Для раствора Рингера $C = 111$ ммоль/л ($NaCl$) + 2 ммоль/л (KCl) = 113 ммоль/л. α для 0,1 N растворов солей типа $NaCl$ или KCl равно примерно 0,83. Следовательно, $i = 1 + \alpha = 1,83$; $iC = 113 \cdot 1,83 = 207$.

Для примера разберем расчет опытного раствора с удвоенным количеством K , или 4 ммоль/л K^+ . Чтобы исследовать влияние только увеличения K^+ на МП и исключить влияние Cl^- , необходимо соблюдать условие $[K^+]_н[Cl^-]_н = const$. Для $NaCl$ и KCl раствора Рингера $[Cl^-]_н = 113$ ммоль/л и $[K^+]_н = 2$ ммоль/л, т. е. $[K^+]_н[Cl^-]_н = 226$. Отсюда можно рассчитать концентрацию Cl^- в опытном растворе: $[Cl^-]_н = 226 : 4 = 56,5$ ммоль/л. Концентрация Na^+ в опытном растворе равна 109 ммоль/л ($113 - 4$). Таким образом, в опытном растворе должно быть: $K^+ — 4$ ммоль/л; $Na^+ — 109$, $Cl^- — 56,5$ ммоль/л.

Весь K можно взять в виде $KCl — 4$ ммоль/л. Тогда остается 52,5 ммоль/л Cl^- ($56,5 - 4$) и из 109 ммоль/л Na^+ только 52,5 ммоль/л можно взять в виде $NaCl$. Остальной Na берут в виде соли, не содержащей Cl^- , чаще всего в виде Na_2SO_4 . Необходимо взять 56,5 ммоль/л Na^+ ($109 - 52,5$). Na_2SO_4 берут 28,5 ммоль/л, так как в каждой молекуле этой соли по 2 атома Na^+ .

Теперь подсчитаем суммарное произведение iC для данного опытного раствора. Для 4 мМ-ного раствора KCl $iC = 1,93 \cdot 4 = 6,82$ (для 0,01 N растворов солей типа KCl $\alpha = 0,93$). Для 52,5 мМ-ного раствора $NaCl$ $iC = 1,83 \cdot 52,5 = 96,075$ (для 0,1 N растворов солей типа KCl $\alpha = 0,83$). Для 28,25 мМ-ного раствора Na_2SO_4 $iC = 2,5 \cdot 28,25 = 70,625$ (для 0,1 N растворов солей типа Na_2SO_4 $\alpha = 0,75$ и $i = 1 + 2\alpha$). Таким образом, суммарное произведение $iC = 6,82 + 96,075 + 70,625 = 173,5$. Как уже упоминалось, для обычного раствора Рингера $iC = 207$. Следовательно, опытный раствор гипотоничен по отношению к раствору Рингера и для изотоничности необходимо добавить сахарозу. Для неэлектролитов $p = CRT$, т. е. концентрация сахарозы $C = 207 - 173,5 = 33,5$ мМ.

Состав опытного раствора следующий: $KCl — 4$ мМ, $NaCl — 52,5$ мМ, $Na_2SO_4 — 28,25$ мМ, сахароза — 33,5 мМ, $CaCl_2 — 1,2$ мМ, $NaHCO_3 — 2$ мМ.

Для приготовления опытных растворов рекомендуется использовать маточные молярные растворы KCl и $NaCl$ и 0,5 М растворы K_2SO_4 и Na_2SO_4 .

При расчете опытных растворов используют следующие величины: 1. Для растворов 2-ионных электролитов (соли типа KCl , $NaCl$) $\alpha = 0,93$ (0,01 N) и 0,83 (0,1 N); $i = 1 + \alpha$. 2. Для растворов 3-ионных электролитов (соли типа K_2SO_4 , Na_2SO_4) $\alpha = 0,87$ (0,01 N) и 0,75 (0,1 N); $i = 1 + 2\alpha$. 3. Для $NaCl$ и KCl нормального раствора

Рингера $iC = 207$. $[K^+]_{II}[Cl^-]_{II} = 226$. 4. Молекулярные массы: KCl — 74,5, $NaCl$ — 58,5, Na_2SO_4 — 142, K_2SO_4 — 174, сахара — 342.

Ход работы. 1. Рассчитать и приготовить опытные растворы: два раствора с увеличенным количеством K (для каждой работающей группы преподаватель сообщает выбранные для нее величины концентраций K^+) и изотонический раствор K^+ (140 ммоль/л K^+).

2. Включить в сеть рН-метр не менее чем за 1 ч до начала измерений.

3. Приготовить препарат: поместить в камеру, вскрыть частично оболочку, сфокусировать биноккуляр.

4. Провести хлорирование серебряных электродов.

5. Опустить микроэлектрод с хлорированным серебряным электродом в камеру с раствором Рингера и измерить межэлектродный потенциал (МЭЛП)¹. После определения МЭЛП ввести микроэлектрод в мышечное волокно, медленно вращая микровинт препаратоводителя. О попадании электрода внутрь клетки судят по отклонению стрелки рН-метра. Например, $МЭЛП = -20$ мВ, после введения в волокно стрелка отклонилась до -95 мВ, следовательно, МП данного волокна равен -75 мВ².

6. Измерить МП у 10—15 мышечных волокон, перед каждым введением электрода определяя МЭЛП. Данные записать в рабочую тетрадь в виде таблицы, перед которой указать номер опыта, время приготовления препарата, время начала опыта.

Используемый раствор	Номер измерения	МЭЛП	Измеренный потенциал	МП

7. Поднять микроэлектрод. Заменить раствор Рингера в камере на 1-й опытный раствор (с менее увеличенной концентрацией K). Мышцу выдержать в опытном растворе 30 мин. Провести измерение МП так же, как в предыдущем случае. Полученные результаты занести в таблицу.

8. Повторить последовательно те же манипуляции со 2-м опытным раствором.

9. Измерить МП мышечных волокон в контрольном растворе.

10. Измерить МП мышцы в изотоническом растворе K^+ .

¹ МЭЛП создается из двух потенциалов: один на границе стекло — KCl , второй — на границе KCl — электролиты клетки. Наибольшую величину дает 1-й потенциал. Если стекло хорошее, то МЭЛП составляет порядка до 10 мВ; если некачественное, то МЭЛП порядка 50 мВ (обычно отрицательный).

² Необходимо иметь в виду, что потенциал кончика микроэлектрода, в основном определяющий МЭЛП, в растворе Рингера может измениться после введения в клетку. Это изменение будет тем меньше, чем меньше МЭЛП в растворе Рингера. В задаче возможность изменения МЭЛП при введении в мышечное волокно не учитывается.

Обработка результатов. Выполненную задачу оформляют в виде протоколов опытов¹. Составляют следующую таблицу:

Номер измерения	$[K^+]_n$, ммоль/л	$\lg [K^+]_n$	МЭЛП, мВ	Измеренный потенциал, мВ	МП, мВ	Отклонение от среднего

Средние величины МП ряда мышечных волокон, зарегистрированных в каждом из растворов, используют для построения графика зависимости МП от $\lg [K^+]_n$. Кроме экспериментальной кривой для этих же концентраций наружного K^+ строят две теоретические кривые (на том же графике). Для первой рассчитывают калиевый равновесный потенциал по уравнению 2, для второй — МП по уравнению 3. Сравнивают теоретические кривые с экспериментальной. Объясняют различия. Пользуясь графиком, определяют концентрацию K^+ в контрольном растворе (по МП).

Рекомендуемая литература: [13] — с. 147—148, 150—153; [29] — с. 20—29, 43—92; [31] — с. 8—19; [37] — с. 91—99; [46] — с. 5—13.

ТЕМА II. ВОЗБУЖДЕНИЕ И ЕГО РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Возникновение возбуждения и генерация потенциала действия (ПД) происходят в том случае, если раздражение, нанесенное на возбудимую клетку, снижает ее МП до определенного уровня² — *критического уровня деполяризации*. Такая реакция на сдвиг МП (на деполяризацию) возможна благодаря тому, что натриевая проводимость мембраны g_{Na} является функцией МП. При нормальном потенциале покоя величина g_{Na} очень мала, снижение МП ведет к ее росту, в результате чего большее количество Na^+ проникает в клетку и ускоряется перенос положительных зарядов внутрь клетки, что способствует еще большему снижению уровня потенциала покоя. Это, в свою очередь, ведет к увеличению натриевой проводимости и т. д. Теоретически при возбуждении МП должен достигнуть уровня натриевого равновесного потенциала, уравнивающего натриевый концентрационный градиент $V_{Na} = 58 \lg [Na^+]_n / [Na^+]_в$. Однако практически этот уровень никогда не достигается вследствие развивающейся натриевой инактивации и действия восстанавливающего фактора — возрастания калиевой проводимости g_K мембраны при деполяризации. Рост g_K мембраны приводит к достаточно быстрому возвращению смещенного МП к исходному уровню потенциала покоя (рис. 55). Быстро протекающее колебание МП (1—3 мс) — *пик*, или *спайк* — достигает величины 100—120 мВ. Для миелинизированных нервных волокон характерно замедление возврата МП в нескольких милливольтах от уровня покоя. Это *отрицательный следовой потенциал*. Его развитие связывают с некоторым накоплением ионов K^+ , вышедших из аксонов, около мембраны перехвата Ранвье благодаря слоям окружающих клеток. У других объектов (например, гигантский аксон кальмара) регистрируют *положительный следовой потенциал* — следовую гиперполяризацию. Ее связывают с временно увеличенной проницаемостью для K^+ .

Нервные и мышечные волокна обладают кабельными свойствами: протоплазма окружена поверхностной мембраной, изолирующей этот цилиндрический

¹ Здесь и далее см. «Общие указания к выполнению и оформлению задач».

² Здесь и далее имеется в виду уменьшение МП по абсолютной величине.

проводник от электролитов межклеточной жидкости. Из-за утечки тока через емкость и сопротивление мембраны подпороговые стимулы распространяются всего на 1—2 мм вдоль волокна. Благодаря регенеративному характеру деполяризации мембраны пороговый сдвиг МП подвергается 4- или 5-кратному усилению. Это компенсирует недостатки кабельной структуры нервного или мышечного волокна и ПД распространяется по всей длине волокна без уменьшения

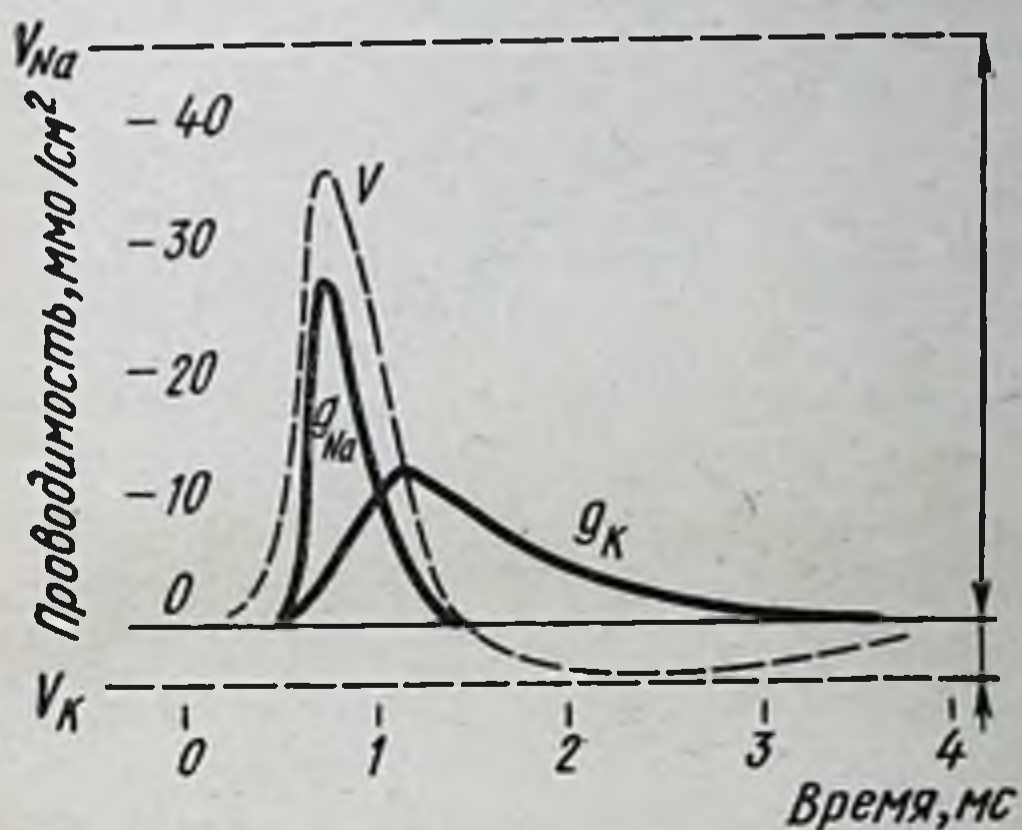


Рис. 55. Кривые распространяющегося потенциала действия V и изменений натриевой g_{Na} и калиевой g_K проводимости, основанные на экспериментальных константах (по А. Hodgkin, 1953); V_{Na} и V_K — уровни натриевого и калиевого потенциалов равновесия

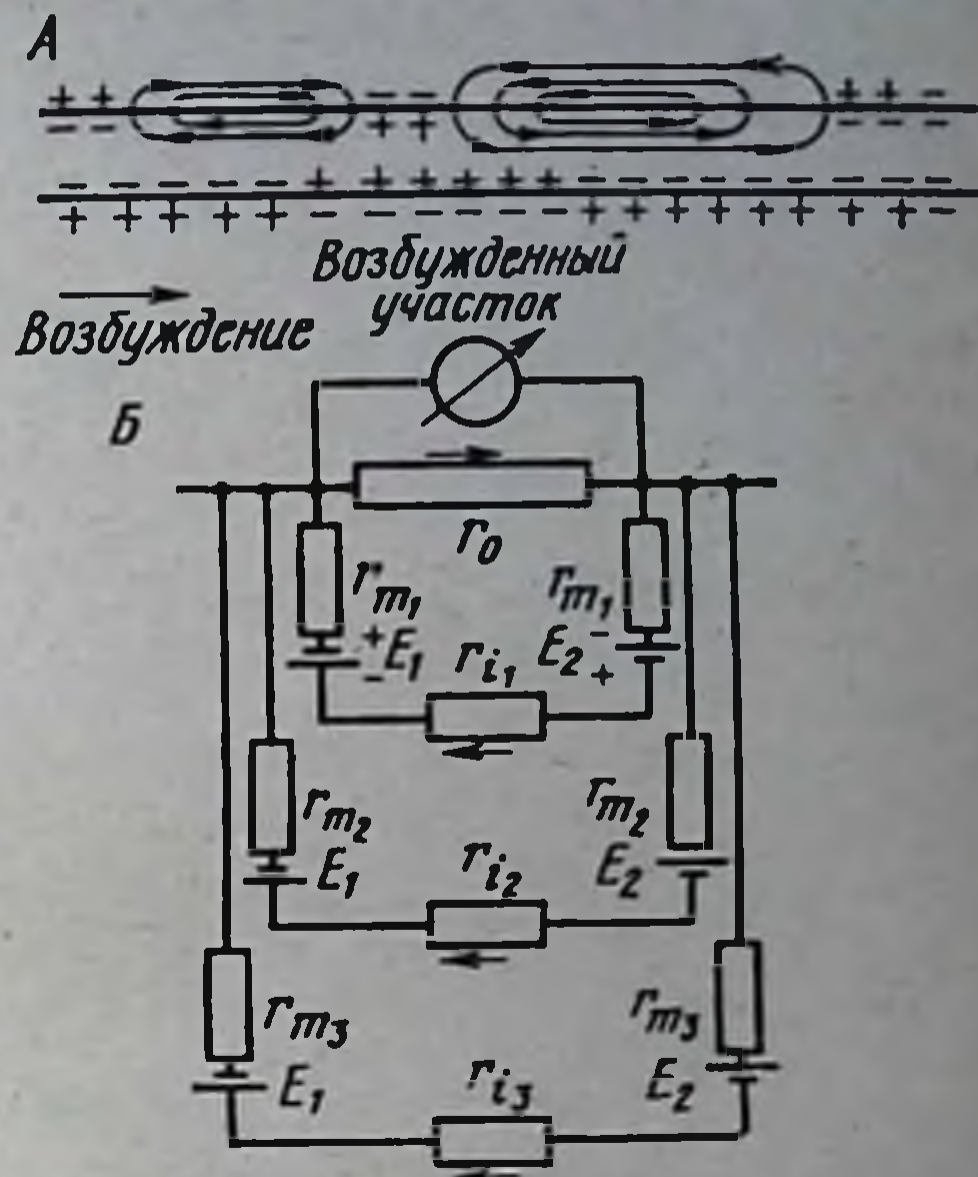


Рис. 56. Местные продольные токи, протекающие от покоящихся участков аксона к перемещающемуся активному участку (А) и упрощенная эквивалентная схема нервного ствола при внеклеточной регистрации ПД (Б):

E_1 и E_2 — э.д.с. мембраны в покое и при возбуждении, r_m — сопротивление мембраны, r_i — сопротивление аксоплазмы трех волокон, r_o — наружное сопротивление, на котором происходит создаваемое местными токами падение потенциала, регистрируемое в опыте; стрелками указано направление токов, текущих внутри и снаружи аксонов

амплитуды. Скорость его распространения, или скорость проведения возбуждения, зависит от внутреннего и внешнего сопротивления клетки, сопротивления и емкости ее мембраны, от амплитуды ПД.

При внеклеточном отведении от нервного ствола регистрируют не изменение потенциала на мембране, а падение напряжения на внеклеточном межэлектродном участке, вызванное протеканием локальных токов вдоль наружной поверхности аксонов от покоящихся участков к активному (рис. 56). Именно с этим связан рост амплитуды регистрируемого внеклеточно ПД при увеличении числа возбужденных аксонов. Кроме того, при внеклеточном отведении регистрирующие электроды расположены на нерве достаточно близко друг к другу по сравнению с длиной волны возбуждения. Последняя равна произведению скорости проведения на длительность возбуждения в данной точке нерва. Так, если принять для седалищного нерва лягушки скорость проведения порядка 40 м/с, а длительность спайка ПД — около 1,5 мс, то длина волны возбуждения будет 60 мм. Рас-

стояние между отводящими электродами при этом порядка 10—15 мм. В таких условиях возбуждение приходит в область II отводящего электрода тогда, когда под I электродом оно еще не закончилось, поэтому амплитуда и длительность фаз внеклеточно регистрируемого двухфазного ПД зависит от расстояния между отводящими электродами. Более постоянны амплитуда и длительность у монофазного ПД, регистрируемого в условиях, когда нерв в области II отводящего электрода поврежден (рис. 57, А, Б).

Любой периферический нерв содержит нервные волокна, отличающиеся друг от друга диаметром и толщиной миелиновой оболочки. Оба эти фактора существенно влияют на скорость проведения возбуждения. Скорость проведения воз-

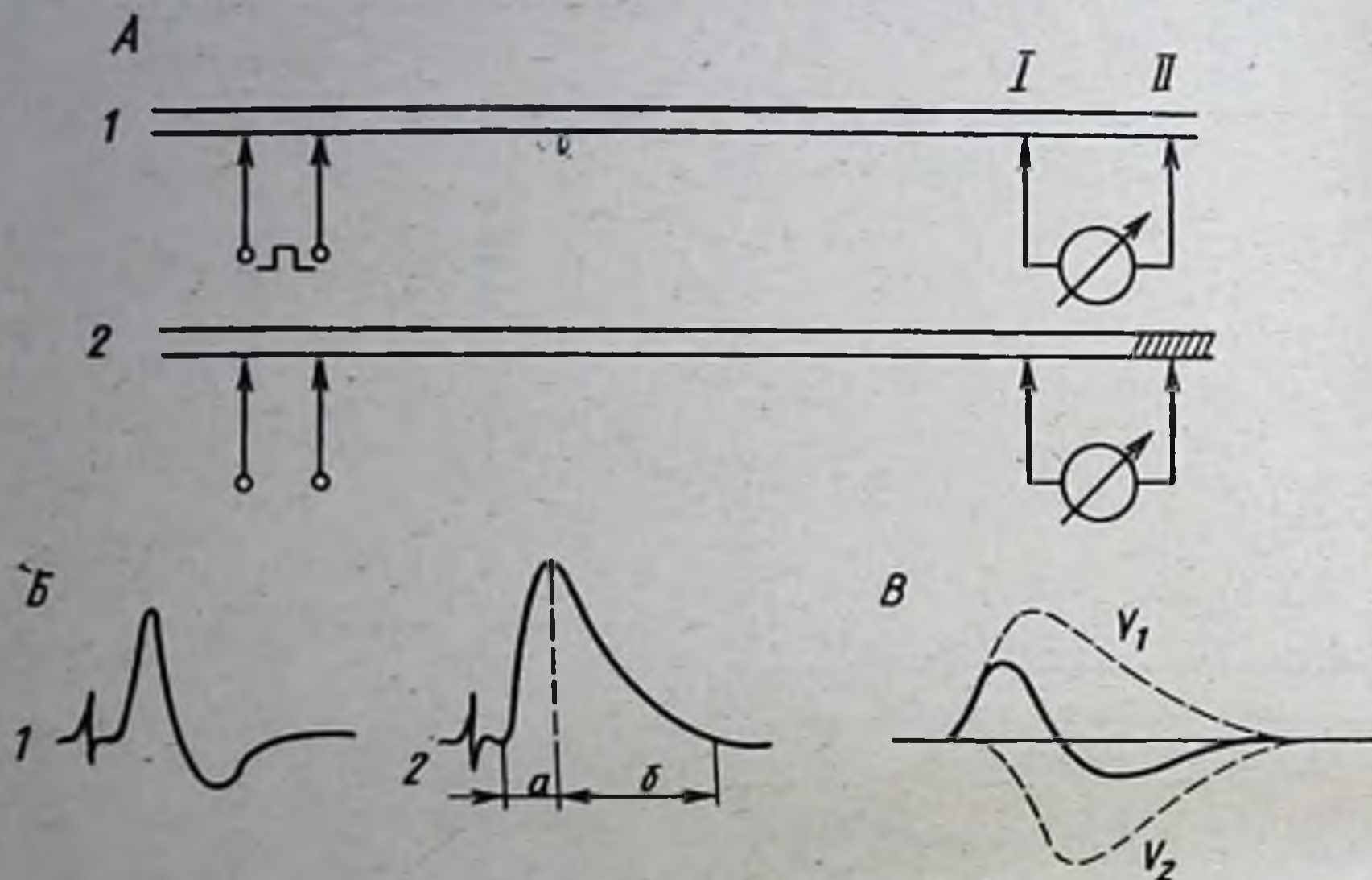


Рис. 57. Регистрация двухфазного (1) и монофазного (2) ПД нерва (А), их вид (Б) и реконструкция двухфазного ПД из двух монофазных V_1 и V_2 (В):

а, б — фазы нарастания и спада монофазного ПД, I, II — отводящие электроды

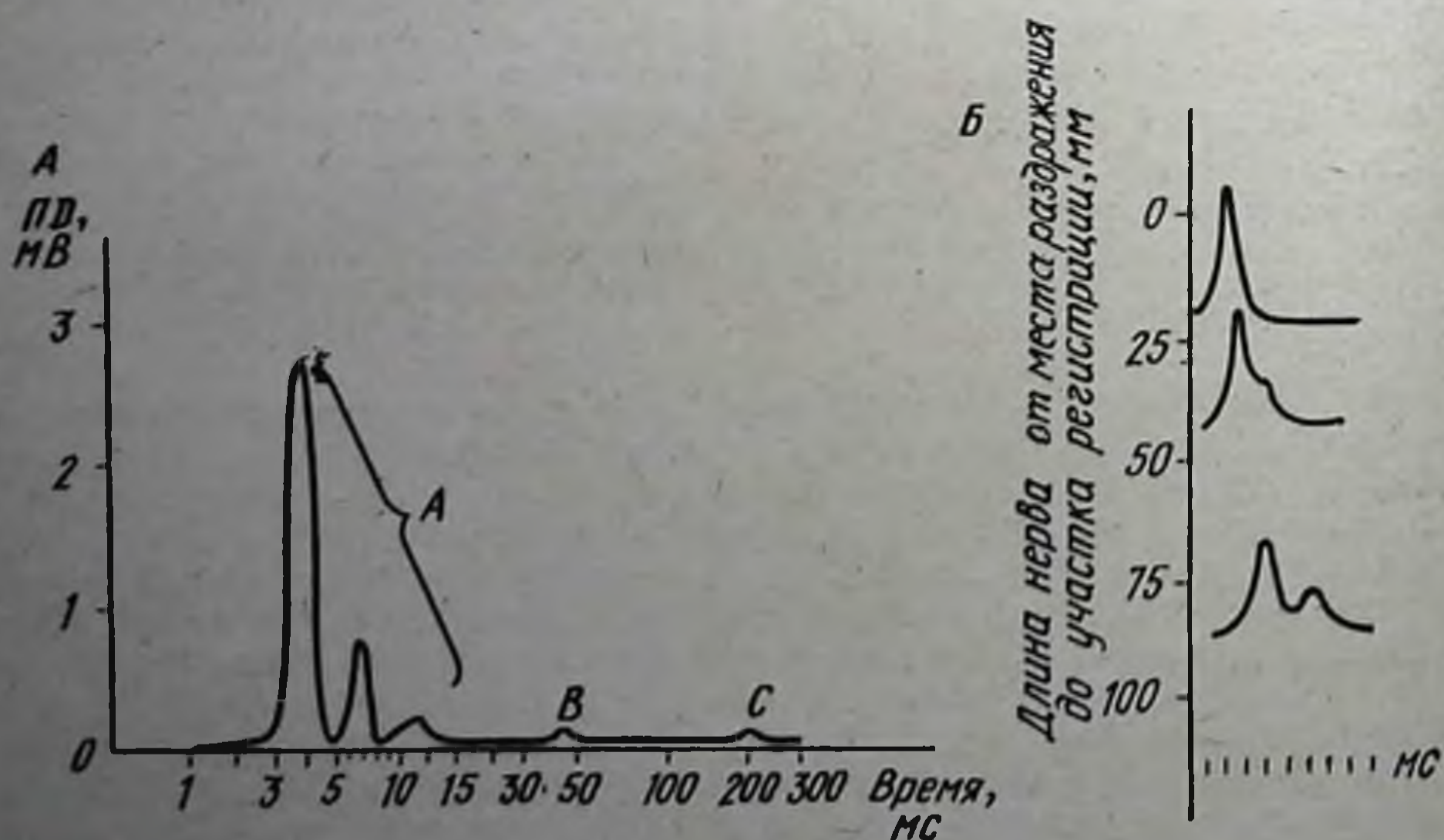


Рис. 58. Реконструкция сложного ПД нервного ствола (А) и его дисперсия (Б) (по Дж. Шаде, Д. Форд, 1976)

буждения по *миелинизированному* волокну (волокно с толстой миелиновой оболочкой) определяется расстоянием между перехватами Ранвье: чем больше межперехватный участок, тем выше скорость проведения. При большем диаметре волокна затухание в этом участке уменьшается, поэтому длина межперехватного участка может быть больше. Кроме того, миелиновая оболочка у волокон с большим диаметром толще и утечка тока в связи с этим меньше. Благодаря этому у миелинизированных волокон большого диаметра длина межперехватного участка больше, надежность передачи импульса при этом сохраняется. Скорость проведения возбуждения пропорциональна диаметру волокна, а не корню из диаметра, как у *безмякотных* волокон (волокна с очень тонким слоем миелина).

Дж. Эрлангер и Г. Гассер, регистрируя внеклеточно ПД седалищного нерва лягушки-быка и располагая отводящие электроды на расстоянии 150 мм от раздражающих, получили ПД сложной формы: кроме высокоамплитудного спайка ПД имел ряд дополнительных колебаний (рис. 58, А). Авторы объяснили этот факт наличием в нерве групп волокон разного диаметра, обладающих различной скоростью проведения, и разделили волокна седалищного нерва на три большие группы: А — миелинизированные волокна с диаметром 2,5—16 мкм и скоростью проведения 15—90 м/с; В — миелинизированные вегетативные волокна с диаметром около 3 мкм и скоростью проведения 10—15 м/с и С — безмякотные волокна с диаметром не более 2 мкм и скоростью 1—2 м/с. Группа А в свою очередь может быть разделена на три подгруппы: α , β и γ . Я. Буреш и соавторы (1962) приводят следующие величины скорости проведения для этих подгрупп, полученные на седалищном нерве травяной лягушки: α -волокна — 42 м/с, β — 25, γ — 16 м/с (рис. 58, Б).

Возбуждение нервных и мышечных клеток сопровождается *рефрактерностью*. Генерация второго ПД во время нисходящей фазы предыдущего спайка невозможна из-за развития натриевой инактивации (нет повышения g_{Na} при деполяризации) и увеличения g_K , которая становится значительно выше натриевой. Поэтому весь период спайка ПД нерв невозбудим — *абсолютный рефрактерный период*. После окончания спайка натриевая инактивация исчезает не мгновенно, а в течение определенного временного интервала. Повышенная калиевая проводимость тоже не сразу возвращается к уровню покоя. В связи с этим в течение некоторого периода после спайка порог раздражения увеличен (понижение возбудимости) и амплитуда генерируемых в этот период ПД ниже нормальной. Это *относительный рефрактерный период* (рис. 59).

Для измерения длительности рефрактерного периода используют *сдвоенные раздражающие стимулы*, временной интервал между которыми можно изменять. 1-й стимул называют *кондиционирующим*. В ответ на него возникает нормальный ПД, который служит эталоном для сравнения. 2-й раздражающий стимул называется *тестирующим*, ибо он помогает определить возбудимость нерва через различные временные интервалы после первого ПД. Об окончании абсолютной рефрактерности судят по появлению ПД на тестирующий стимул при постепенном увеличении интервала между 1-м и 2-м стимулами от нуля. Об окончании относительной рефрактерности судят по восстановлению либо амплитуды эталонного ПД, либо прежнего порога раздражения при дальнейшем увеличении интервала между 1-м и 2-м стимулами.

Цель работы. Исследовать параметры двухфазного и монофазного ПД. Определить ско-

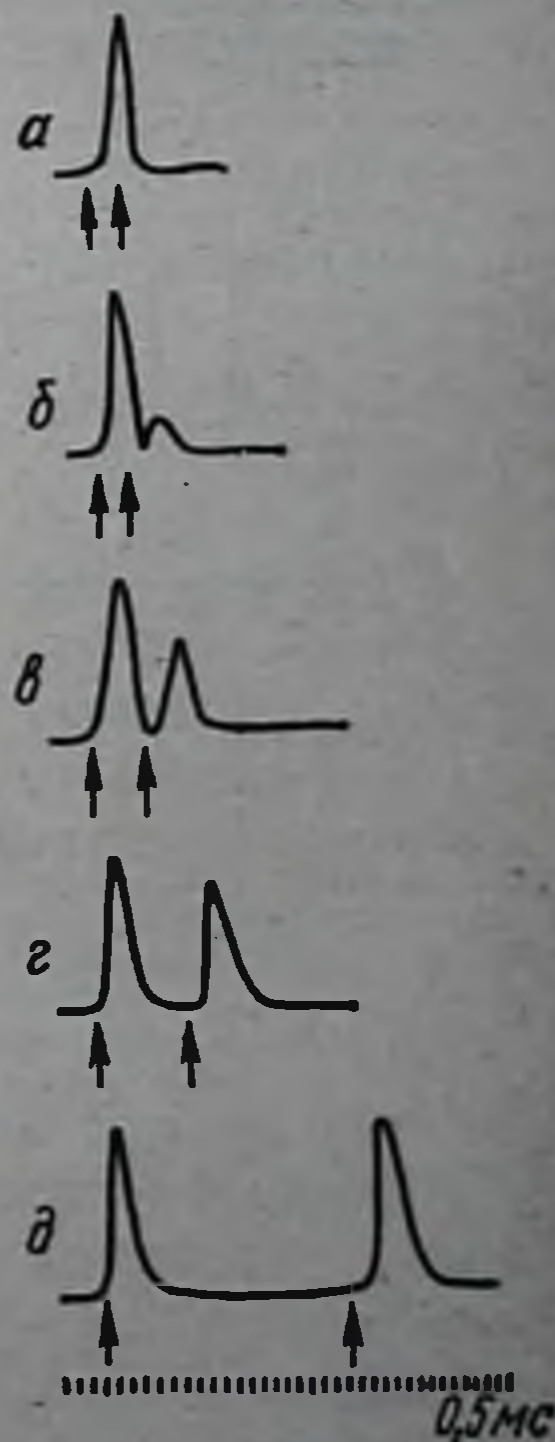


Рис. 59. Восстановление возбудимости и амплитуды ПД нерва (а—д) по мере увеличения интервала между кондиционирующим и тестирующим стимулами (указаны стрелками)

рость проведения возбуждения группы волокон нервного ствола. Измерить абсолютную и относительную рефрактерность нерва и исследовать ее зависимость от температуры окружающей среды.

Задача 1. Регистрация двухфазного и монофазного потенциала действия нерва при внеклеточном отведении

Методика. В работе используют седалищный нерв крупной лягушки, выделенный от позвоночника до коленного сустава. Оставляют

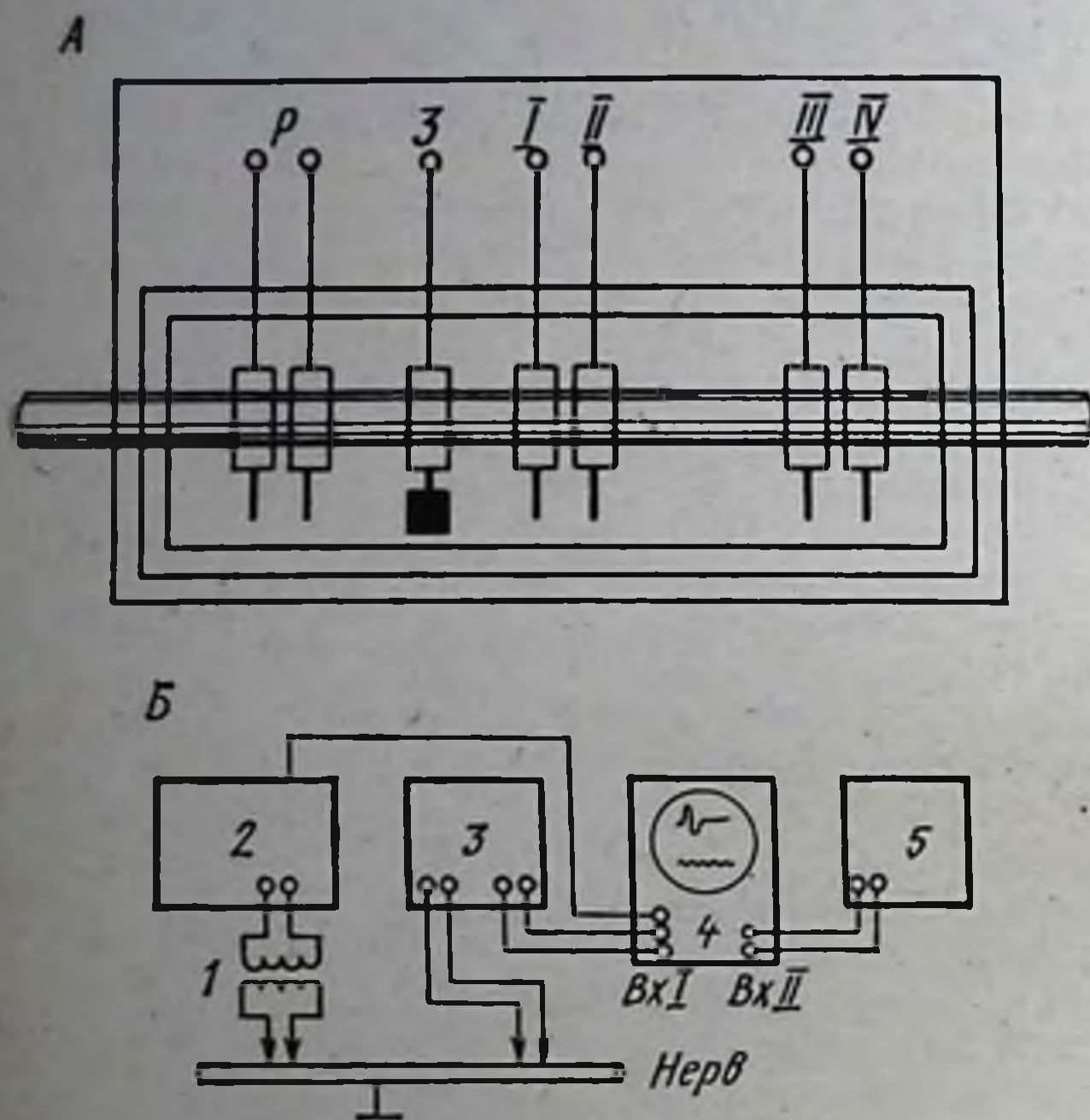


Рис. 60. Камера (А) и блок-схема установки (Б) для внеклеточной регистрации ПД нерва:

P — раздражающие электроды, 3 — заземляющая пластинка, *I*, *II* и *III*, *IV* — две пары отводящих электродов; 1 — понижающий трансформатор, 2 — стимулятор, 3 — усилитель биопотенциалов, 4 — двухлучевой осциллограф, 5 — звуковой генератор для отметки времени; *Вх* — входы осциллографа

ром — отметку времени (синусоида от звукового генератора, 1000 Гц). Используют ждущую развертку, запуская ее импульсами стимулятора (60, Б). Регистрацию проводят фотоаппаратом типа «Зенит» с экрана осциллографа (диафрагма полностью открыта, выдержка 1/30 или «В»). Для удобства съемки на экран осциллографа укрепляют специально сделанную трубу, в конец которой плотно вставляют объектив фотоаппарата с подобранным для данного фокусного расстояния переходным кольцом.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 20—40 Гц, длительность раздражающего стимула 0,1—0,5 мс, на усилителе — рассчитанную полосу частот пропускания (если принять в первом приближении, что время нарастания ПД составляет примерно

небольшой кусок позвоночника. На нерв около сустава накладывают лигатуру, ниже которой нерв перерезают. За лигатуру и часть позвоночника нерв приподнимают и помещают во влажную камеру на расположенные там электроды (рис. 60, А). Электроды укреплены в подвижных каретках, чтобы можно было менять расстояние между ними.

Для раздражения нерва используют стимулятор прямоугольных импульсов типа ЭСЛ-1 или ЭСЛ-2 с изолирующим трансформатором на выходе. Для регистрации ПД необходим усилитель биопотенциалов УБП и двухлучевой осциллограф. На одном канале осциллографа регистрируют ПД, на вто-

0,1 мс¹. Включить приборы. Поставить такое усиление, чтобы калибровочный импульс в 1 мВ давал отклонение луча осциллографа примерно на 10 мм. Проверить, хорошо ли видна синусоида от звукового генератора (отметка времени — 1 мс).

2. Приготовить препарат, поместить нерв на электроды так, чтобы его часть, содержащая больше волокон (около позвоночника), лежала на раздражающих электродах. На участок нерва, расположенный на заземляющей пластинке, поместить маленький ватный тампон, смоченный раствором Рингера. Дно камеры должно быть сухим. Камеру плотно закрыть смазанной безводным вазелином крышкой.

3. Найти порог и максимальную силу раздражения. Записать в рабочую тетрадь номер опыта, время начала опыта, величины пороговой и максимальной сил раздражения. Проверить, удобно ли работать при установленном усилении. Амплитуда ПД при максимальной силе раздражения должна занимать больше половины экрана осциллографа.

4. При сверхмаксимальной силе раздражения (в 1,5—2 раза больше максимальной) сфотографировать двухфазный ПД. Измерить длину нерва между I и II отводящими электродами (см. рис. 60, А).

5. Повредить нерв в области II отводящего электрода и зарегистрировать монофазный ПД при тех же условиях раздражения. При том же усилении сфотографировать калибровочный импульс.

Обработка результатов. При оформлении работы измеряют амплитуды 1-й и 2-й фаз двухфазного ПД (мВ), их длительность (мс); амплитуду монофазного ПД, длительность его фаз нарастания и спада (см. рис. 57, Б) и общую длительность, рассчитывают среднюю скорость нарастания ПД. После выполнения задачи этой темы рассчитывают время проведения от I до II отводящего электрода, используя полученные величины скорости проведения. На основании этих расчетов и промеров монофазного ПД реконструируют двухфазный ПД из двух монофазных (см. рис. 57, В) и сравнивают его с зарегистрированным в опыте.

Задача 2. Определение скорости проведения возбуждения по нерву

Методика. Для выполнения задачи используют препарат седалищного и малоберцового нервов, выделенных от позвоночника до стопы. Всю препаровку проводят под слоем раствора Рингера. На дистальный конец нерва накладывают лигатуру, за нее и кусочек позвоночника нерв переносят в камеру. Используют ту же камеру и установку, что и в предыдущей задаче.

Ход работы. 1. Подготовить к работе установку, как в предыдущей задаче.

2. Поместить препарат в камеру. Чтобы увеличить длину участка нерва между двумя парами отводящих электродов (см. рис. 60, А и 61, А), часть нерва между ними поместить на дно камеры и лишь самый

¹ Расчет проводят по формулам, приведенным в разделе I.

кончик нерва расположить на $III—IV$ отводящих электродах. На участок нерва, лежащий на заземляющей пластинке, поместить смоченный раствором Рингера ватный тампон. Камеру плотно закрыть крышкой, края которой смазаны безводным вазелином.

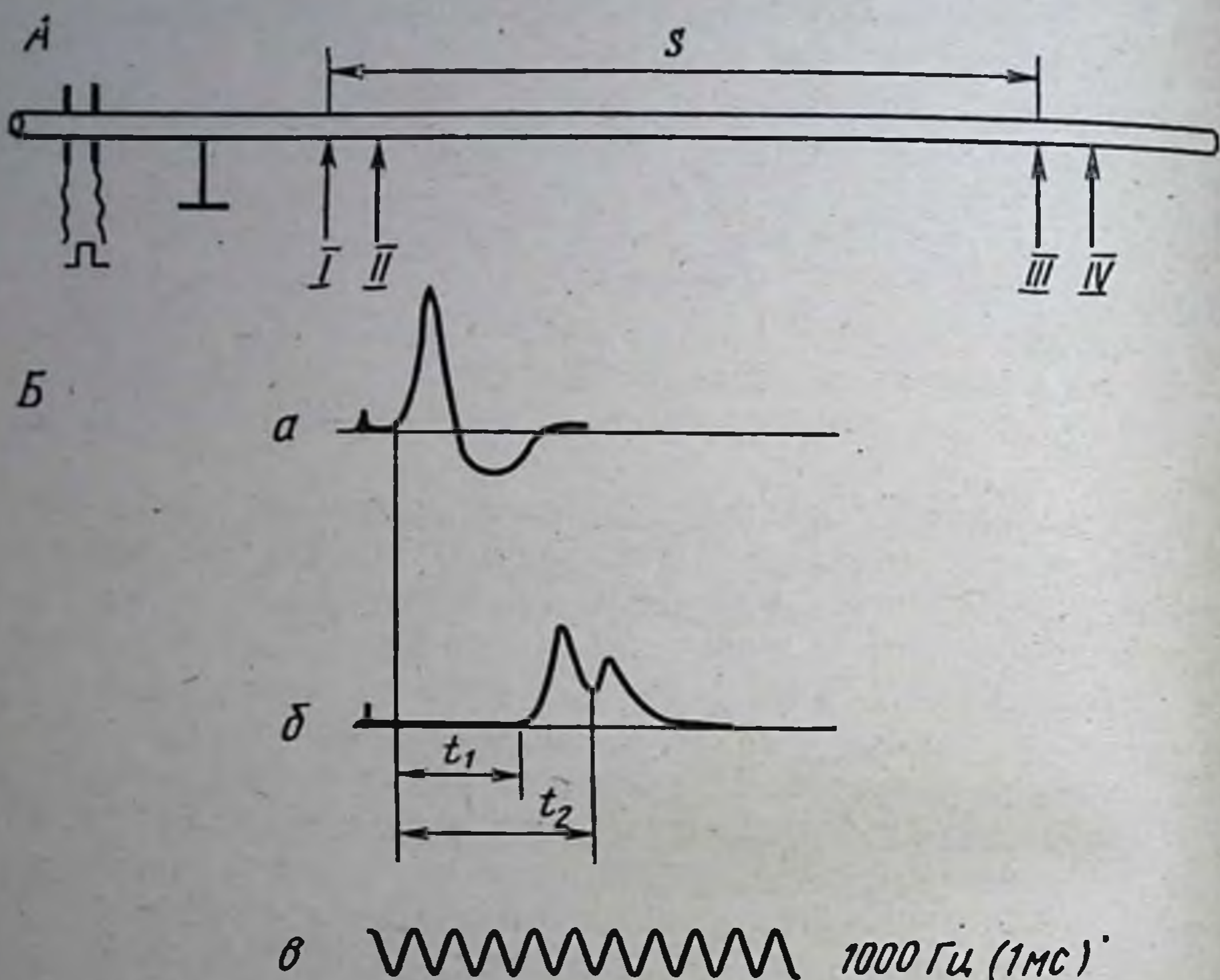


Рис. 61. Регистрация ПД нерва при измерении скорости проведения возбуждения (А) и ПД под $I—II$ (а) и $III—IV$ (б) электродами (Б):

S — длина участка нерва, измеряемая в опыте, t_1 , t_2 — измеренное в опыте время проведения возбуждения через участок нерва S для α - и β -волокон группы А; в — метка времени от звукового генератора

3. Найти порог и максимальную силу раздражения при частоте 20—40 Гц и длительности стимула 0,1—0,5 мс. Записать все в рабочую тетрадь.

4. При сверхмаксимальной силе раздражения зарегистрировать поочередно ПД, отводимые от $I—II$ и $III—IV$ электродов. На втором канале осциллографа регистрируется отметка времени. Дисперсия второго ПД от $III—IV$ электродов видна лучше, если он будет монофазным.

5. В конце опыта чернилами поставить метки на нерве в точках над I и III отводящими электродами и измерить длину участка нерва между ними (рис. 61, А).

Обработка результатов. По фоторегистрациям измеряют время от момента нанесения раздражения (артефакт)¹ до начала ПД при его

¹ Артефакт раздражения вызывается небольшой утечкой тока от стимулятора, улавливаемой усилителем. Он регистрируется точно в тот момент, когда на нерв наносят электрическое раздражение.

отведении от I—II и III—IV электродов. Определяют время проведения возбуждения от I до III отводящих электродов (рис. 61, Б). Зная длину участка нерва и время проведения возбуждения по этому участку для разных групп волокон, рассчитывают скорости проведения этих групп волокон и сравнивают полученные результаты с данными других авторов [13, 19, 57].

З а д а ч а 3. Распределение волокон седалищного нерва лягушки по диаметрам

Электрофизиологические наблюдения целесообразно сочетать с рассмотрением и описанием гистологических препаратов поперечных срезов нерва.

Методика. Используют микроскоп МБ-9 и микроскоп М-9 с вертикальным тубусом, рисовальный аппарат, окуляр-микрометр и объект-микрометр. Просматривают и зарисовывают препараты поперечных срезов седалищного нерва лягушки, окрашенных на миелин по Гейденгайну или на осевые цилиндры по Глиссу. Рисунки выполняют на миллиметровой бумаге.

Ход работы. 1. Рассмотреть при малом увеличении внутриствольное строение нерва и расположение пучков. На этих же препаратах подсчитать число миелинизированных и немиелинизированных волокон.

2. Прорисовать участок среза нервного ствола при увеличении 90×10 с использованием иммерсионного масла. Каждый студент должен прорисовать определенный участок поперечного среза, затем материал, полученный всей группой, объединить и составить общий рисунок среза нервного отдела.

3. Подсчитать для каждого рисунка распределение волокон по диаметрам, для чего с помощью объект-микрометра определить цену деления на миллиметровой бумаге и нанести калибровочную линию длиной 10 мкм.

Обработка результатов. В протоколах опытов помещают рисунок участка поперечного среза нерва и составляют таблицу состава участка среза по диаметру волокон. По данным всей группы подготавливают общую таблицу состава поперечного среза нерва по диаметру волокон и график процентного распределения волокон по диаметрам.

З а д а ч а 4. Исследование зависимости амплитуды потенциала действия нервного ствола от силы раздражения¹

Методика. Препарат, камера, установка, условия раздражения и регистрации те же, что в задаче 1.

Ход работы. 1. Включить приборы, установить используемые параметры раздражения и усиления.

¹ Задачи 4, 5, 6 — дополнительные.

2. Приготовить препарат и поместить его в камеру.

3. Зарегистрировать монофазные ПД при разных силах раздражения от пороговой до сверхмаксимальной. Если использовали одно усиление, то калибровочный импульс (1 мВ) сфотографировать в конце опыта. Если усиление в течение опыта измеряли, то калибровочный сигнал фотографировать при каждом усилении.

4. Записать в рабочую тетрадь: номер опыта, порог раздражения, номер кадра — соответствующая сила раздражения.

5. Повторить опыт не менее чем на трех препаратах.

Обработка результатов. По фоторегистрациям измеряют амплитуду ПД при разных силах раздражения и заполняют таблицу.

Номер препарата	Сила раздражения, В или мВ	Амплитуда ПД, мВ

По этим данным строят график зависимости амплитуды нерва от силы раздражения и объясняют ее с использованием эквивалентной схемы внеклеточного отведения (см. рис. 56, Б).

З а д а ч а 5. Исследование зависимости порога раздражения от длительности раздражающего стимула

Методика. Препарат, камера, установка, условия регистрации те же, что в задаче 1.

Ход работы. 1. Включить приборы, установить нужное усиление.

2. Приготовить препарат седалищного нерва и поместить в камеру.

3. Визуально определить пороги раздражения при различных длительностях раздражающего стимула, начиная с наименьшей: 0,01 — 0,05 мс. Длительность стимула постепенно увеличивать до тех пор, пока пороги раздражения при двух соседних длительностях не станут одинаковыми.

4. Опыт повторить не менее чем на трех препаратах. Полученные данные записать в таблицу.

Номер препарата	Длительность раздражающего стимула, мс	Порог раздражения, В или мВ

Обработка результатов. По данным таблицы строят графики зависимости пороговой силы раздражения от длительности раздражающего стимула. Отложив на оси абсцисс величину *реобазы* — наименьшей пороговой силы раздражения, одинаковой для двух соседних больших длительностей стимула, — определяют по графику *полезное время* — наименьшую длительность стимула, соответствующую рео-

базе. Отложив на оси абсцисс две реобазы, находят по графику *хро-наксию* — длительность стимула при пороговой силе в две реобазы. Зная эти величины, вычисляют константу a в уравнении кривой «силы — длительности»: $i = a/t + b$, где i — пороговая сила тока, t — длительность раздражающего стимула, b — реобазы при $t = \infty$. Зная константы a и b , строят теоретическую кривую «силы — длительности» и сравнивают ее с экспериментальной.

Задача 6. Исследование зависимости потенциала действия нерва от наружной концентрации натрия

Методика. Используют тот же препарат седалищного нерва лягушки, что в задаче 1, только лигатуры (из тонкого шелка) накладывают и около коленного сустава и около позвоночника. Соответственно дистальнее и проксимальнее лигатур нерв перерезают. Препарат помещают в камеру, состоящую из пяти изолированных отделов, соединенных небольшими отверстиями (рис. 62). Используют ту же установку, что для задачи 1.

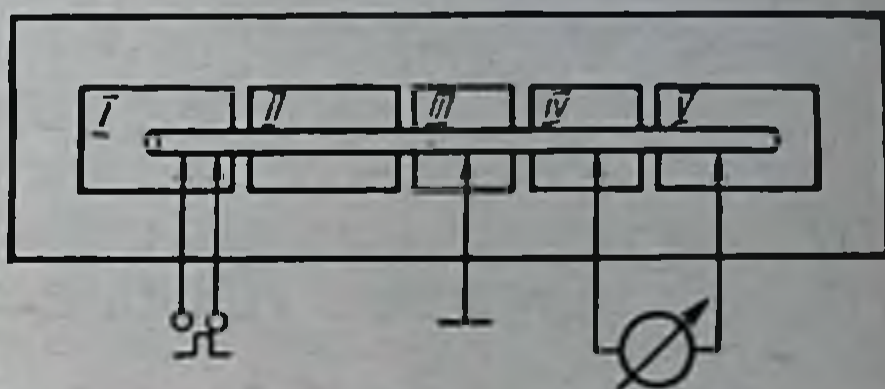


Рис. 62. Камера для регистрации ПД нерва при исследовании его зависимости от наружной концентрации Na^+ (объяснение см. в тексте)

Кроме обычного раствора Рингера для холонокровных и изотонического раствора К (140 ммоль/л) в работе используют опытные растворы Рингера с уменьшенным количеством Na (28, 14 и 9 ммоль/л). Для сохранения осмотического давления недостающий NaCl заменяют сахарозой. Принципы расчетов такого рода разобраны в задаче темы I этого раздела.

Ход работы. 1. Рассчитать и приготовить растворы.

2. Приготовить препарат. С помощью тонкой проволоочки, укрепляемой на лигатуре, более тонкий конец нерва протянуть через отверстия между отделами камеры. Фиксировать нерв за лигатуры в I и V отделах. Отверстия около нерва замазать безводным вазелином. В I отделе расположены раздражающие электроды, поддерживать там условия влажной камеры. Во II, III и IV отделы налить раствор Рингера, в V — изотонический KCl . Плотнo закрыть камеру крышкой.

3. Электроды I отдела камеры соединить с выходом стимулятора. Электрод III отдела заземлить. Электроды IV и V отделов соединить с входом УБП.

4. Установить на стимуляторе частоту раздражения 20—40 Гц и длительность стимула 0,1—0,5 мс. Проверить степень усиления, отметку времени.

5. Через 30 мин после помещения препарата в камеру начать опыт¹,

¹ Волокна седалищного нерва покрыты рядом оболочек, что сильно затрудняет диффузию ионов. Для того чтобы непосредственно около волокон (в межклеточном пространстве) создавалась та же концентрация ионов, что и в растворе, налитом в отдел камеры, необходимо время в 30—40 мин.

2. Приготовить препарат и поместить его в камеру.

3. Зарегистрировать монофазные ПД при разных силах раздражения от пороговой до сверхмаксимальной. Если использовали одно усиление, то калибровочный импульс (1 мВ) сфотографировать в конце опыта. Если усиление в течение опыта измеряли, то калибровочный сигнал фотографировать при каждом усилении.

4. Записать в рабочую тетрадь: номер опыта, порог раздражения, номер кадра — соответствующая сила раздражения.

5. Повторить опыт не менее чем на трех препаратах.

Обработка результатов. По фоторегистрациям измеряют амплитуду ПД при разных силах раздражения и заполняют таблицу.

Номер препарата	Сила раздражения, В или мВ	Амплитуда ПД, мВ

По этим данным строят график зависимости амплитуды нерва от силы раздражения и объясняют ее с использованием эквивалентной схемы внеклеточного отведения (см. рис. 56, Б).

Задача 5. Исследование зависимости порога раздражения от длительности раздражающего стимула

Методика. Препарат, камера, установка, условия регистрации те же, что в задаче 1.

Ход работы. 1. Включить приборы, установить нужное усиление.

2. Приготовить препарат седалищного нерва и поместить в камеру.

3. Визуально определить пороги раздражения при различных длительностях раздражающего стимула, начиная с наименьшей: 0,01 — 0,05 мс. Длительность стимула постепенно увеличивать до тех пор, пока пороги раздражения при двух соседних длительностях не станут одинаковыми.

4. Опыт повторить не менее чем на трех препаратах. Полученные данные записать в таблицу.

Номер препарата	Длительность раздражающего стимула, мс	Порог раздражения, В или мВ

Обработка результатов. По данным таблицы строят графики зависимости пороговой силы раздражения от длительности раздражающего стимула. Отложив на оси абсцисс величину *реобазы* — наименьшей пороговой силы раздражения, одинаковой для двух соседних больших длительностей стимула, — определяют по графику *полезное время* — наименьшую длительность стимула, соответствующую рео-

базе. Отложив на оси абсцисс две реобазы, находят по графику *хро-наксию* — длительность стимула при пороговой силе в две реобазы. Зная эти величины, вычисляют константу a в уравнении кривой «силы — длительности»: $i = a/t + b$, где i — пороговая сила тока, t — длительность раздражающего стимула, b — реобаза при $t = \infty$. Зная константы a и b , строят теоретическую кривую «силы — длительности» и сравнивают ее с экспериментальной.

Задача 6. Исследование зависимости потенциала действия нерва от наружной концентрации натрия

Методика. Используют тот же препарат седалищного нерва лягушки, что в задаче 1, только лигатуры (из тонкого шелка) накладывают и около коленного сустава и около позвоночника. Соответственно дистальнее и проксимальнее лигатур нерв перерезают. Препарат помещают в камеру, состоящую из пяти изолированных отделов, соединенных небольшими отверстиями (рис. 62). Используют ту же установку, что для задачи 1.

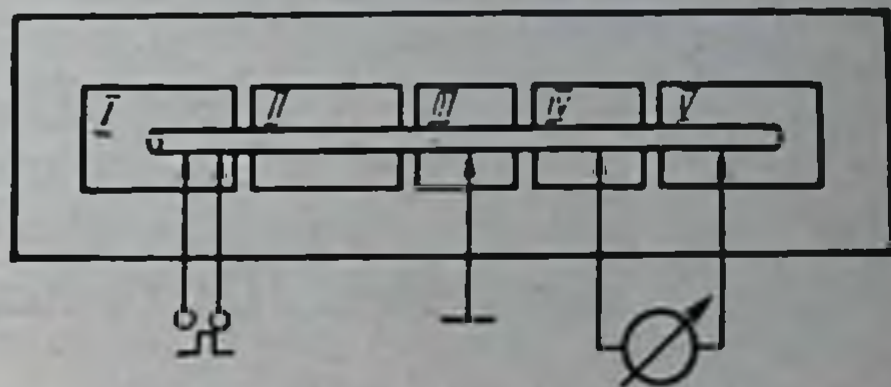


Рис. 62. Камера для регистрации ПД нерва при исследовании его зависимости от наружной концентрации Na^+ (объяснение см. в тексте)

Кроме обычного раствора Рингера для холоднокровных и изотонического раствора К (140 ммоль/л) в работе используют опытные растворы Рингера с уменьшенным количеством Na (28, 14 и 9 ммоль/л). Для сохранения осмотического давления недостающий NaCl заменяют сахарозой. Принципы расчетов такого рода разобраны в задаче темы I этого раздела.

Ход работы. 1. Рассчитать и приготовить растворы.

2. Приготовить препарат. С помощью тонкой проволоочки, укрепляемой на лигатуре, более тонкий конец нерва протянуть через отверстия между отделами камеры. Фиксировать нерв за лигатуры в I и V отделах. Отверстия около нерва замазать безводным вазелином. В I отделе расположены раздражающие электроды, поддерживать там условия влажной камеры. Во II, III и IV отделы налить раствор Рингера, в V — изотонический KCl . Плотнo закрыть камеру крышкой.

3. Электроды I отдела камеры соединить с выходом стимулятора. Электрод III отдела заземлить. Электроды IV и V отделов соединить с входом УБП.

4. Установить на стимуляторе частоту раздражения 20—40 Гц и длительность стимула 0,1—0,5 мс. Проверить степень усиления, отметку времени.

5. Через 30 мин после помещения препарата в камеру начать опыт¹,

¹ Волокна седалищного нерва покрыты рядом оболочек, что сильно затрудняет диффузию ионов. Для того чтобы непосредственно около волокон (в межклеточном пространстве) создавалась та же концентрация ионов, что и в растворе, налитом в отдел камеры, необходимо время в 30—40 мин.

найти порог и максимальную силу раздражения. При сверхмаксимальной силе раздражения сфотографировать монофазный ПД (на втором канале осциллографа — отметку времени).

6. Заменить в IV отделе камеры обычный раствор Рингера на опытный, содержащий 28 ммоль/л Na. Через 30—40 мин сфотографировать монофазный ПД при тех же условиях раздражения и усиления.

7. Заменить раствор в IV отделе камеры на опытный с 14 ммоль/л Na и через 30—40 мин вновь провести фоторегистрацию ПД при тех же условиях раздражения и усиления.

8. Заменить раствор в IV отделе камеры на опытный с 9 ммоль/л Na и через 30—40 мин зарегистрировать ПД.

9. Заменить опытный раствор обычным раствором Рингера. Дождавшись восстановления ПД, сфотографировать его.

10. Сфотографировать в конце опыта калибровочный сигнал.

Обработка результатов. Измеряют амплитуды зарегистрированных ПД, длительность фаз нарастания и спада. Рассчитывают среднюю скорость нарастания ПД. Сравнивают эти параметры ПД при разных концентрациях наружного Na. Строят график зависимости средней скорости нарастания ПД от логарифма наружной концентрации Na^+ .

Задача 7. Определение абсолютной и относительной рефрактерности нерва

Методика. Используют препарат седалищного нерва лягушки, приготовленный так же, как в задаче 1. Для работы необходима камера такого же типа, как в задаче 1 (см. рис. 60, А) с одной парой раздражающих электродов, заземляющей пластинкой и одной парой отводящих электродов. В работе используют установку, как в задаче 1. Она отличается только стимулятором, используемым для раздражения. Для нанесения сдвоенных раздражающих прямоугольных стимулов на практикуме применяют два стимулятора с одинаковой регулировкой длительности (например, типа ЭСЛ-2), соединенных между собой определенным образом и работающих как один прибор. Частота подачи сдвоенных стимулов, их амплитуда и длительность (одинаковая) регулируются как обычно. Шкала регулятора длительности стимулов одного из стимуляторов в такой ситуации показывает длительность интервала между кондиционирующим и тестирующим стимулами в паре.

Ход работы. 1. Установить длительность каждого из сдвоенных стимулов, равную 0,1 мс. Интервал между стимулами в паре свести к минимуму (меньше 0,01 мс). Установить частоту подачи сдвоенных стимулов порядка 20—40 Гц. Проверить полосу частот пропускания и усиление на УБП (см. задачу 1).

2. Приготовить препарат, поместить его в камеру. На участок нерва, расположенный на заземляющей пластинке, наложить ватный тампон, смоченный раствором Рингера. Камеру плотно закрыть крышкой, смазанной безводным вазелином.

3. Найти порог и максимальную силу раздражения для кондиционирующего, 1-го, стимула; 2-й стимул будет попадать в абсолютную

рефрактерную фазу при минимальном интервале и не будет вызывать ответа.

4. Увеличивая интервал времени между раздражающими стимулами в паре (сила раздражения сверхмаксимальная), определить длительность абсолютной рефрактерной фазы (АРФ) по появлению второго ПД (см. рис. 59). Увеличить силу раздражения и проверить, правильно ли определена АРФ. Если при увеличении силы раздражения АРФ стала короче: ПД появился при меньшем интервале, значит при 1-м определении сила раздражения была недостаточной, чтобы вызвать возбуждение в самом начале относительной рефрактерной фазы (ОРФ), когда возбудимость очень низка. Увеличивая силу раздражения, добиться постоянства величины измеряемой АРФ.

5. Определить относительный рефрактерный период, увеличивая интервал между кондиционирующим и тестирующим стимулами до тех пор, пока 2-й ПД не станет равным по амплитуде 1-му.

6. Для исследования динамики восстановления амплитуды 2-го ПД в течение ОРФ сфотографировать с экрана (как в задаче 1) 4—5 возрастающих ПД, измерить их амплитуду и сравнить с 1-м ПД либо измерить (мм) на экране осциллографа амплитуду ПД на кондиционирующий стимул и 4—5 ПД на тестирующий стимул до их выравнивания. В рабочей тетради отметить, при каких интервалах между 1-м и 2-м стимулами сделана фоторегистрация или проведено измерение.

7. Для исследования динамики восстановления возбудимости определить порог раздражения в самом начале ОРФ (конец АРФ) и, увеличивая интервал между 1-м и 2-м стимулами, 4—5 раз определить пороги раздражения в разные моменты ОРФ. Когда порог раздражения станет таким же, как на кондиционирующий стимул, определенный в начале опыта, можно считать, что возбудимость нерва восстановилась.

8. Опыт повторить не менее 5—6 раз на нескольких препаратах.

Обработка результатов. При оформлении протоколов опытов данные по длительности АРФ и ОРФ представляют в виде таблицы, в конце которой приводят средние величины их длительности. По данным таблицы о восстановлении амплитуды ПД и возбудимости в период ОРФ строят графики и сравнивают их.

Номер препарата	Длительность, АРФ, мс	Длительность ОРФ, мс	
		по восстановлению амплитуды ПД	по восстановлению возбудимости

Задача 8. Исследование зависимости абсолютной и относительной рефрактерных фаз от температуры

Методика. Препарат, камера и установка те же, что в предыдущей задаче.

Ход работы. 1. Выделить два седалищных нерва одной лягушки. Каждый препарат поместить в отдельную чашку Петри с раствором Рингера. Один препарат оставить на 1 ч при комнатной температуре (измерить ее), 2-й препарат поместить на 1 ч в холодильник (желательно, чтобы разница температур была не меньше 10°C).

2. Через 1 ч как можно быстрее определить АРФ и ОРФ по восстановлению амплитуды ПД.

3. Можно провести опыт в иной модификации. После выделения нервов определить у них АРФ и ОРФ и провести опыт с охлаждением, как описано выше. После измерения АРФ и ОРФ охлажденного и контрольного нервов оставить их при комнатной температуре еще на 30—40 мин. Вновь измерить АРФ и ОРФ обоих препаратов. При такой постановке опыта учитываются возможные изменения рефрактерности в связи с тем, что препарат длительное время находился в растворе Рингера.

4. Можно провести опыт с нагревом нерва. Чашку Петри с опытным препаратом поместить в термостат с температурой $27\text{—}30^{\circ}\text{C}$. Через 1 ч определить АРФ и ОРФ у опытного и контрольного нервов.

5. В одной из модификаций опыт повторить на нескольких препаратах (не менее трех пар нервов).

Обработка результатов. Полученные результаты сводят в таблицу.

Номер опыта	Препарат (опытный, контрольный)	Температура раствора, $^{\circ}\text{C}$	АРФ, мс	ОРФ, мс	Изменения			
					АРФ		ОРФ	
					мс	%	мс	%

В конце таблицы указывают средние величины АРФ и ОРФ. По результатам длительности АРФ и ОРФ при разной температуре, выраженным в %, строят диаграммы.

Рекомендуемая литература: [13] — с. 20—25, 140—146, 184—187, 196—199, 225—228; [29] — с. 32—42, 93—118; [37] — с. 100—141; [19] — с. 5—30; [48] — с. 21—40, 58—90; [57] — гл. I, IX.

ТЕМА III. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБИЛЬНОСТИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО ПРЕПАРАТА

Явление «торможения Введенского» легко продемонстрировать при ритмическом раздражении двигательного нерва и регистрации ПД в аксонах, мышечных волокнах, или потенциалов концевой пластинки. Начиная с определенной частоты, разной для этих звеньев нервно-мышечного препарата, ритм возбуждения не будет соответствовать ритму раздражения. Эта закономерность проявляется в виде *пессимума* и *оптимума* частоты при раздражении нерва и регистрации ПД мышцы (рис. 63).

Микроэлектродные исследования позволили разделить процессы трансформации ритмов возбуждения в нервно-мышечном синапсе при пессимуме Введенского на *постсинаптическую* и *пресинаптическую* фазы. При больших частотах

раздражения удалось выявить слитную деполяризацию постсинаптической мембраны при пессимуме (рис. 64). Опыты на изолированных волокнах лягушки и гигантских аксонах кальмара, изучение пессимальных реакций у катода при регистрации местных процессов показали, что процесс пессимальной трансформации ритма в начале раздражения полностью определяется рефрактерными свойствами волокон, следовыми изменениями возбудимости после очередного ПД в ряду, изменениями латентных периодов, что создает периодическое блокирование импульсов. Периодическое выпадение нервных импульсов объясняется с помощью простых закономерностей, учитывающих изменения абсолютной рефрактерной фазы и процесс восстановления возбудимости в стадии относительной рефрактерности. При навязывании ритма и длительном раздражении периодическая трансформация чаще всего сменяется кратной. Пессимум частоты в нерве у катода раздражающего тока и трансформация ритмов в участке блокирования разной длины могут быть также объяснены с точки зрения электротонических изменений, процесса перехода местного ответа в распространяющуюся волну. В опытах с трансформацией ритма в охлажденном участке получены теоретические доказательства важнейшего положения теории Н. Е. Введенского, что волна возбуждения, вступая в парабиотический участок, углубляет парабиоз (рис. 65, А, В).

Проблема лабильности включает исследование *синхронизации ритмов* возбуждения и раздраже-

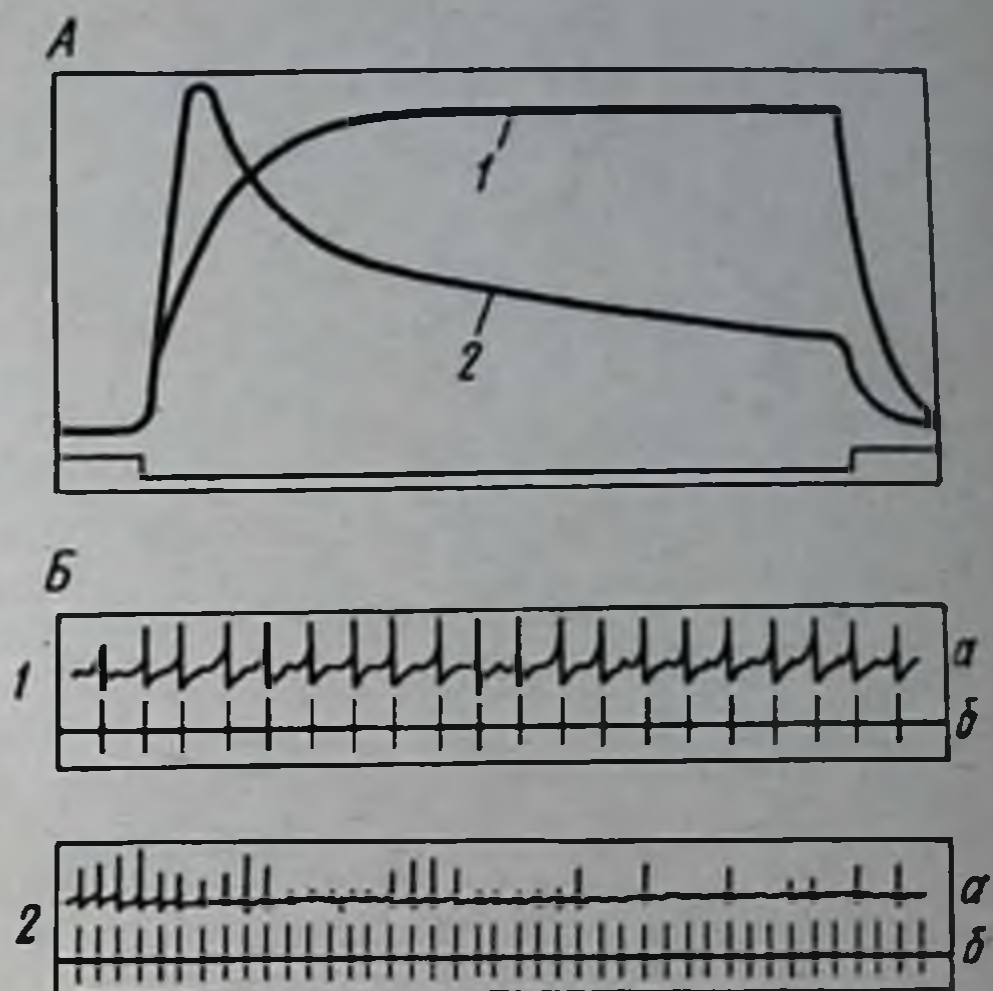


Рис. 63. Оптимум и пессимум частоты нервно-мышечного препарата лягушки. А — оптимальный (1) и пессимальный (2) тетанусы при раздражении нерва с частотой 80 и 200 имп/с; Б — ПД мышцы (а) и нерва (б) при раздражении теми же частотами.

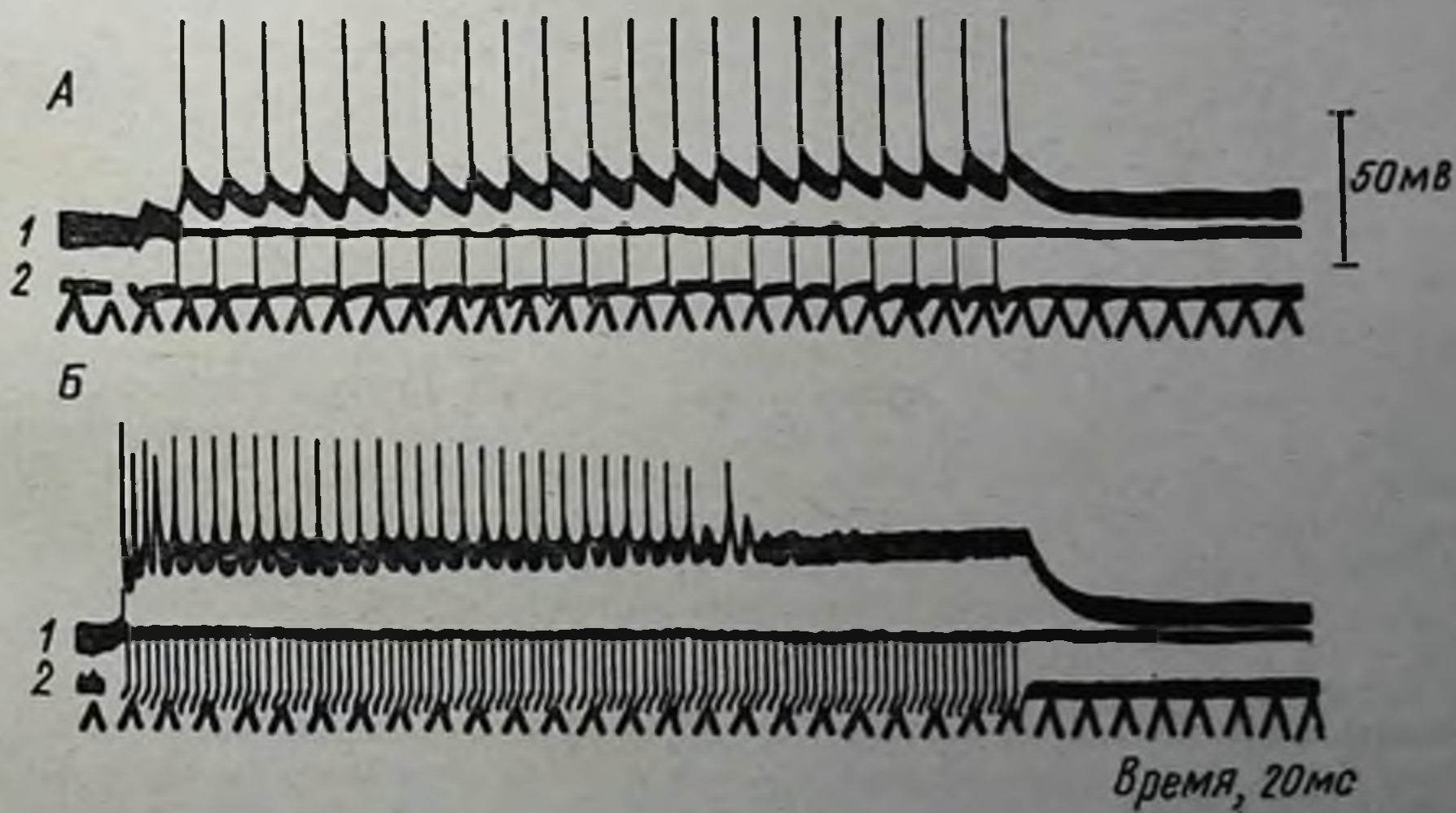


Рис. 64. Изменение критического потенциала скелетного мышечного волокна (1) при оптимальном (А) и пессимальном (Б) ритмах раздражения двигательного нерва (2) (по Н. М. Шамариной, 1961)

ния, т. е. изменений вероятности возникновения ПД в аксоне, мышечном волокне, клетке в результате увеличения амплитуды деполяризующих стимулов. Пороговые ответы нерва нерегулярны, изменяются по амплитуде. Эта флуктуация амплитуды ПД зависит от изменения числа одновременно возбуждающихся нервных волокон. Регистрация флуктуаций выявляет периодический процесс, определяющийся параметрами стимула: пассивной де-

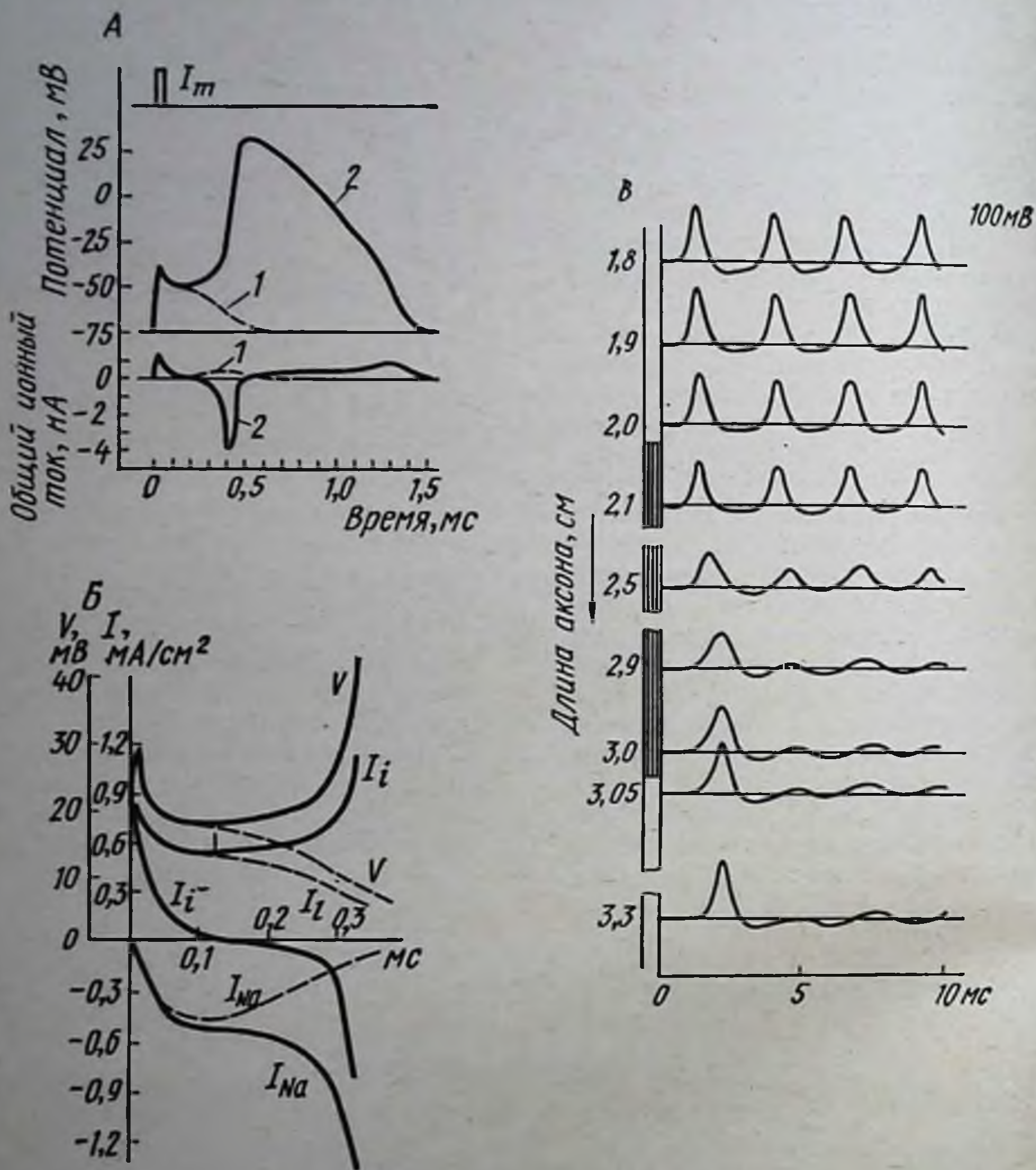


Рис. 65. Моделирование ритмических процессов при возбуждении аксона. А — изменения общего ионного тока во время локального ответа (1) и ПД (2) в перехвате Ранвье при действии короткого стимула I_m (по F. Doodge, 1963); Б — критическая деполяризация мембраны при действии стимулов короткой длительности (0,01 мс) на модели мембраны перехвата Ранвье; сплошной линией обозначены изменения для пороговой (6,23 мА/см²), пунктирной — для околопороговой (6,20 мА/см²) плотности тока (по Б. И. Ходорову, 1969); В — пессимальное торможение в участке «теоретического» гигантского аксона при 3-кратном снижении максимальной величины натриевой проводимости (участок показан штриховкой); стрелкой указано направление распространения импульса (по Б. И. Ходорову, Е. Н. Тимину, 1971):

V — потенциал, I_{Na} , I_p , I_i — натриевый, общий ионный токи и ток утечки

поляризации и свойствами местного подпорогового ответа. При коротких по длительности стимулах эти флуктуации определяются тем, что ПД возникают после выключения стимула (деполяризующий ток), и только местный ответ доводит мембранный потенциал до критического уровня деполяризации. За короткое время стимула натриевая проницаемость не успевает существенно увеличиться, и поэтому ее нарастание, обуславливающее возникновение локального ответа и ПД, происходит только по окончании стимула на следах убывающего электротонического потенциала. Расчет мембранных токов при стимулах длительностью 100 мс и надпороговой или подпороговой амплитудой указывает на их незначительное различие по величине на начальных этапах, однако в 1-м случае возникает локальный ответ, переходящий в ПД, а во 2-м — только местный ответ (рис. 65, Б).

При ритмических раздражениях процессы, определяющиеся пассивной деполяризацией и величиной локального ответа, значительно меняются с увеличением продолжительности стимулов. При этом не только чередуются пассивные и смешанные активно-пассивные изменения мембранного потенциала в каждом волокне, но меняется и число волокон, участвующих в генерации ПД.

Электрофизиологический анализ лабильности как параметра меняющегося состояния возбудимых образований позволяет определить *объективные критерии* состояния нервно-мышечного препарата по характеру ритмов ПД нерва и мышцы, навязываемых ритмической стимуляцией нерва. Исходным критерием лабильности Н. Е. Введенского был принят *максимальный ритм*, воспроизводимый нервно-мышечным препаратом. Анализ оптимальных ритмов возбуждения был проведен особенно тщательно на одиночных образованиях: аксонах и синапсах. Эти данные совпадают с результатами, полученными при изучении авторитмической активности, генерируемой мембраной клеток при действии постоянного тока.

Цель работы. Зарегистрировать одновременно ПД нерва и мышцы в условиях ритмического раздражения нерва при изометрическом режиме сокращения мышц. Определить оптимальные и пессимальные ритмы возбуждения нерва и мышцы. Зарегистрировать характер трансформации ритмов возбуждения при передаче возбуждения с нерва на мышцу и изменение лабильности нервно-мышечного препарата и нервного ствола под влиянием различных факторов. Установить зависимость пороговых флуктуаций ПД нерва от параметров ритмического раздражения. Сравнить пороговые флуктуации ПД нерва и ПД мышцы, а также суммарные ПД мышцы и ПД отдельных моторных единиц.

З а д а ч а 1. Электрофизиологическая характеристика оптимума и пессимума нервно-мышечного препарата

Методика. Используют нервно-мышечный препарат: икроножная мышца — седалищный нерв лягушки, помещенный во влажную воздушную камеру. В одном ее отсеке растягивают двумя булавками мышцу, в другом — через щель в перегородке протягивают нерв и размещают его на раздражающих и отводящих электродах и на заземляющей пластинке (рис. 66). Мышечные потенциалы отводят с помощью пары игольчатых электродов. Камеру плотно закрывают крышкой, смазанной вазелином. Для раздражения нерва используют стимулятор типа ЭСЛ-2 с изолирующим трансформатором. ПД усиливают с помощью двухканального усилителя типа УБП и регистрируют на шлейфовом осциллографе или с экрана лучевого осциллографа фотоприставкой ФОР-4. Для визуального контроля служит двухлучевой осциллограф.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражающих стимулов 10 имп/с длительностью 0,5 мс. Раздражая нерв, определить пороговую силу раздражения, при которой появляются нерегулярные ПД мышцы. Длительность периода каждого раздражения не должна превышать 0,5 с, чтобы не вызвать утомление препарата.

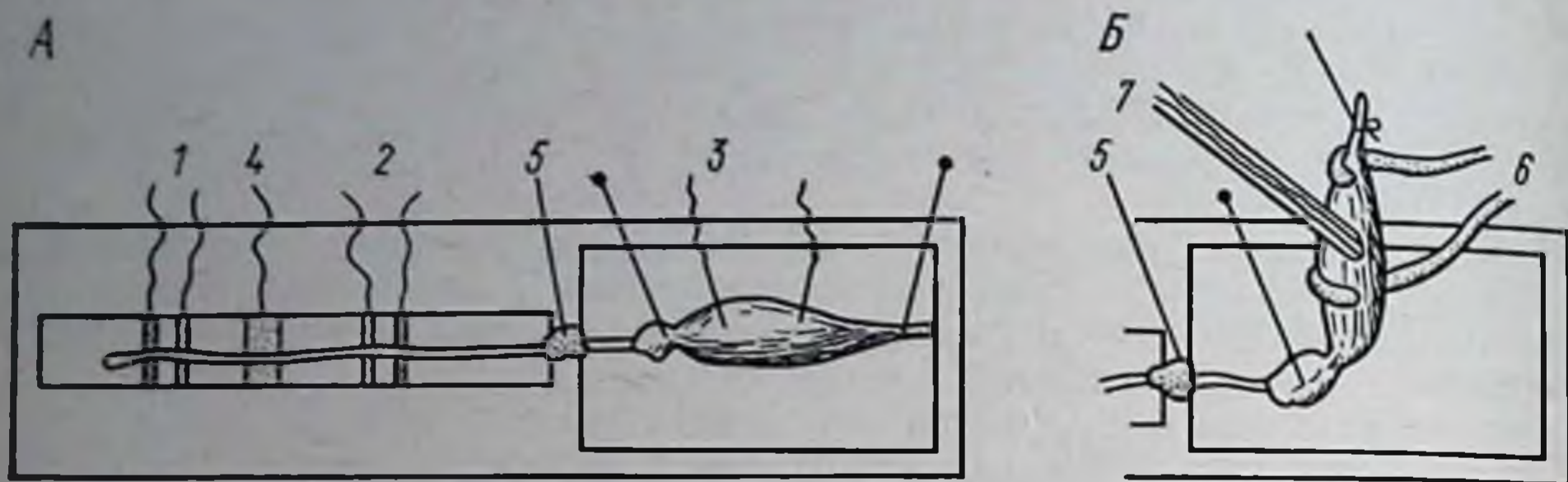


Рис. 66. Камера для изучения лабильности нервно-мышечного препарата (А, Б):

1 — раздражающие электроды, 2 и 3 — отводящие электроды нерва и мышцы, 4 — заземляющая пластинка, 5 — изолирующая вазелиновая перегородка, 6 — фитильковые электроды для регистрации ПД мышцы, 7 — серебряные электроды для регистрации ПД мышечных единиц, помещенные в канал инъекционной иглы

2. Определить максимальную силу раздражения. После 5—10 мин перерыва определить оптимальную и пессимальную частоту нерва и мышцы. Для этого установить на стимуляторе максимальную силу раздражения при длительности стимула 0,5 мс и регистрировать ПД нерва и мышцы при раздражениях пачками импульсов с частотой 20, 40, 60, 80, 100, 200 имп/с, повторить раздражение с частотой 20 имп/с. Продолжительность каждого раздражения не более 1—2 с, интервалы между ними 1—2 мин. Цикл раздражений повторить не ранее чем через 15 мин.

3. После регистрации каждого цикла записать калибровочный сигнал (1 мВ), подаваемый с калибратора УБП.

4. Установить на стимуляторе максимальную силу раздражения (длительность 0,5 мс) и регистрировать изменение ПД нерва и мышцы при непрерывном раздражении нерва в течение 5—10 с, плавно повышая частоту раздражения от 20 до 200 имп/с, а затем уменьшая ее от 200 до 20 имп/с.

Задача 2. Влияние растяжения мышцы на ритмические процессы нервно-мышечной передачи

Методика. Используют препарат: портняжная мышца — седалищный нерв лягушки (рис. 67).

Ход работы. 1. Заранее измерить длину бедра лягушки и закрепить портняжную мышцу в камере таким образом, чтобы ее длина не превышала эту величину (см. рис. 66, А). Условия сокращения мышцы изометрические.

2. Установить на стимуляторе ранее определенную максимальную силу раздражения при длительности стимула 0,5 мс.

3. Отводящие электроды вколоть в проксимальный (безнервный) участок мышцы и зарегистрировать ПД нерва и мышцы при тетанических раздражениях нерва сериями импульсов с частотой 80, 100, 150 имп/с. Продолжительность каждого раздражения 1—2 с, интервалы между ними — 1—2 мин.

4. Растянуть портняжную мышцу на 10—15% от первоначальной длины и повторить опыт при тех же параметрах раздражения, регистрируя ПД нерва и мышцы.

5. Возвратить мышцу к исходной длине и вновь повторить ту же серию раздражений.

Задача 3. Формирование ритмов ПД при пороговом раздражении нерва

Методика. Работу выполняют в двух вариантах, используя методические указания к задаче 1.

Вариант 1. Регистрация колебаний пороговых ответов нерва и мышцы, вызванных непрерывным ритмическим раздражением нерва, в зависимости от силы и длительности раздражающих стимулов.

Ход работы. 1. Установить частоту раздражающих стимулов 20—40 имп/с, длительностью 0,05 мс. Найти пороговую силу раздражения.

2. Включить регистрирующее устройство и, раздражая нерв в течение 2—5 с, наблюдать и регистрировать с экрана электронно-лучевого осциллографа флуктуацию ПД нерва и мышцы при неизменных параметрах раздражающего тока.

3. Установить длительность раздражающего стимула 0,1 мс и при непрерывном раздражении нерва незначительно увеличивать силу раздражающего тока, регистрируя при этом ПД нерва и мышцы.

4. Установить ранее определенную пороговую силу раздражения при длительности стимула 0,1 мс и регистрировать флуктуации ПД нерва и мышцы при непрерывном раздражении нерва; не прекращая раздражения, увеличить длительность стимула до 0,25 и 0,5 мс.

Вариант 2. Регистрация пороговых флуктуаций суммарного ПД мышцы и ПД отдельных моторных единиц.

Ход работы. 1. На проксимальный и дистальный концы мышцы поместить отводящие фитильковые электроды (см. рис. 66, Б); одновременно в центральную часть мышцы вколоть серебряные электроды (толщина кончиков 200—300 мкм), покрытые лаком по всей длине, кроме кончиков.

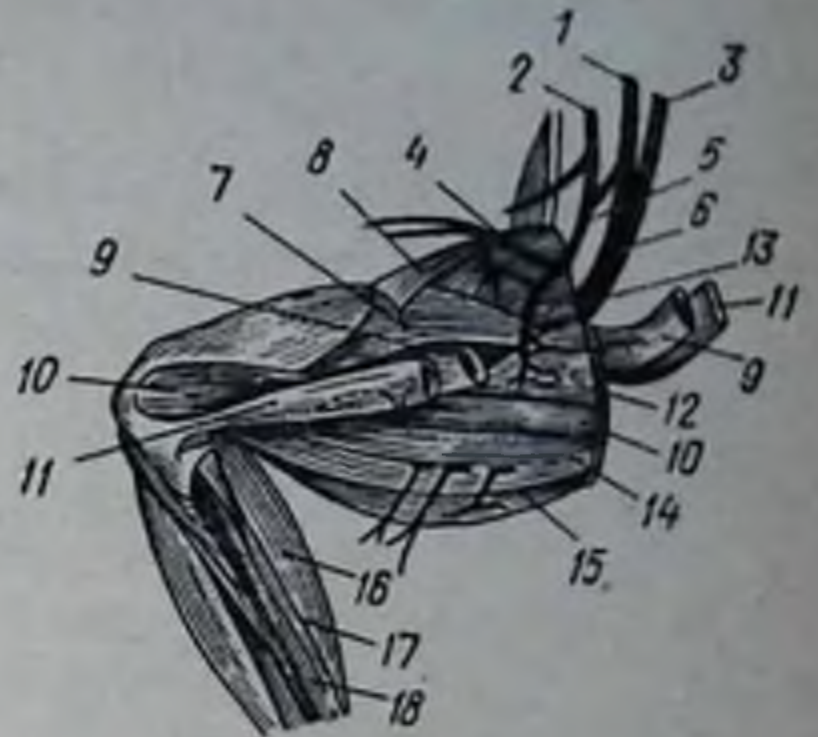


Рис. 67. Нервы и мышцы нижней стороны правого бедра лягушки (по П. В. Терентьеву, 1950):

1, 2, 3 — n. spinalis IX, VIII, X, 4 — n. cutaneus femoris lateralis, 5 — n. cruralis (n. femoralis anterior), 6 — n. ischiadicus (n. femoralis posterior), 7, 8 — m. triceps (7 — передняя головка, m. cruralis, 8 — средняя головка, m. tensor fasciae latae), 9 — m. adductor longus, 10 — m. adductor magnus, 11 — m. sartorius, 12 — m. pectineus, 13 — m. iliacus internus (iliopsoas), 14, 15 — m. gracilis major et minor (rectus internus), 16 — m. gastrocnemius, 17 — n. tibialis superficialis, 18 — m. tibialis posticus

2. Установить частоту раздражения 20—40 имп/с, длительность 0,5 мс и определить пороговую силу раздражения. Визуально определить минимальный ответ мышцы по ее вздрагиванию в ответ на раздражение.

3. Непрерывно раздражая нерв в течение 2—5 с, регистрировать ПД мышцы и отдельных моторных единиц.

Задача 4. Трансформация ритмов возбуждения при распространении волны возбуждения через участок блокирования нерва

Методика. Выпрепаровывают оба седалищных нерва; один служит контролем, на участке второго создают блок проведения. Используют две камеры для регистрации ПД нерва.

Ход работы. 1. Определить максимальную силу раздражения при длительности стимула 0,5 мс.

2. Зарегистрировать ПД нервов при раздражениях с частотой 60, 100, 140, 200, 300 и 400 имп/с. Продолжительность каждого раздражения 1—2 с с интервалом в 1—2 мин.

Вариант 1. Камеру с опытным нервом поместить в холодильник с температурой $+5^{\circ}\text{C}$, камеру с контрольным препаратом оставить при комнатной температуре. Через 20—30 мин повторить цикл раздражений и сравнить ответы обоих нервов.

Вариант 2. Небольшой участок опытного нерва (7—10 мм) между раздражающими и отводящими электродами поместить в маленький сосуд, заполненный 2%-ным раствором новокаина или изотоническим раствором KCl. Раздражая оба нерва максимальными по величине стимулами при длительности 0,5 мс и частоте 200 имп/с, зарегистрировать ПД контрольного нерва и опытного нерва до и после участка блокирования.

Обработка результатов. При обсуждении результатов обращают внимание на следующие вопросы. Каковы характеристики суммарных ПД нерва и мышцы? На основании каких показателей нейрограммы и миограммы можно судить о максимальном ритме возбуждения в нерве и мышце? Как различаются процессы утомления и трансформации ритма возбуждения по характеру отводимых ПД мышцы?

Рекомендуемая литература. [14] — с. 141—173; [59] — с. 506—511; [47] — с. 44—104, 149—177; [67] — с. 57—139.

ТЕМА IV. ВРЕМЕННОЕ ПОВЫШЕНИЕ РАБОТОСПОСОБНОСТИ МЫШЦЫ ПРИ РИТМИЧЕСКОМ РАЗДРАЖЕНИИ НЕРВА

Ослабление или прекращение мышечной функции в результате деятельности мышцы называется *утомлением*. При утомлении мышцы происходит сложный комплекс изменений в возбудимой системе, миофибриллах, а также в обуславливающих сокращение миофибрилл энергетических процессах. При изучении процессов утомления на уровне целого организма и на изолированном нервно-мышечном препарате необходимо учитывать, что кроме гуморальных влияний на течение биохимических процессов в мышце определенную роль играет нервная проводимость.

При исследовании регуляции мышечной деятельности используют «кривую утомления» — огибающую ряд сокращений скелетной мышцы, вызванных одиночными ритмическими раздражениями нерва. Скорость и характер убывания высоты сокращений служат мерилем развивающегося утомления и выражаются рядом последовательных явлений (рис. 68). 1 — «лестница» — первоначально наблюдающееся возрастание высот максимальных одиночных сокращений. Это явление противоположно утомлению по своему внешнему выражению и отражает процесс «вхождения» в работу. 2 — период «плато» — высота одиночных сокращений некоторое время не меняется, хотя в мышце развивается процесс утомления, не отражающийся в механограмме. 3 — период «быстрого спада» высот сокращений. Это наиболее отчетливый показатель утомления, зависящий от ритма сокращений и состояния препарата до опыта. Продолжаясь 2—3 мин, он особенно отчетливо проявляется при большой частоте (3—4 имп/с). В этот период начинается *контрактура* мышцы — ее неполное расслабление после очередного сокращения, в результате чего следующее сокращение начинается раньше, чем мышца полностью расслабилась после предыдущего сокращения. 4 — период «медленного спада». Он характеризуется продолжительностью во времени и заканчивается флуктуациями сокращений по высоте, что особенно хорошо выражено при отсутствии контрактуры. Флуктуации начинаются тогда, когда произошло значительное снижение высоты сокращений мышцы (до $1/4$ от первоначальной высоты и более).

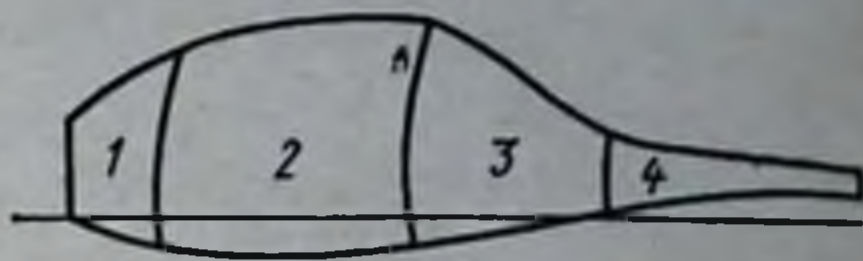


Рис. 68. «Кривая утомления» при одиночных ритмических раздражениях нерва нервно-мышечного препарата лягушки:

1 — «лестница», 2 — «плато», 3 — период «быстрого спада», 4 — период «медленного спада»

«Кривую утомления» применяют также при исследовании мышцы, сохранившей с организмом нервную и нейрогуморальную связь. На разных стадиях — «лестница», «плато», «быстрый спад» и «медленный спад» — мышца по-разному реагирует на временное учащение раздражающих стимулов, на временное прекращение раздражения («эффект отдыха»), на увеличение нагрузки. По-разному проявляется в разные фазы «кривой утомления» и симпатический эффект, открытый Л. А. Орбели, и А. Г. Гинецинским.

Процесс утомления и его временное снятие в разные фазы «кривой утомления» показаны на изолированных одиночных мышечных волокнах с сохраненной иннервацией. При непрямом раздражении большая часть мышечных волокон быстро переходит к флуктуирующему ритму, т. е. происходит не снижение амплитуды сокращения мышечного волокна, а периодическое прекращение его работы. В других мышечных волокнах процесс утомления проявляется в уменьшении силы сокращения. Увеличение частоты раздражения, растяжение мышечного волокна приводят к уменьшению флуктуаций, чем и объясняется временное снятие утомления при применении этих проб.

При тетанических раздражениях нерва возникает феномен «*посттетанической потенциации*» (посттетаническое усиление сокращений), которая проявляется в те же периоды, что и «*феномен Беритова*» (увеличение высоты сокращений мышцы при повышении частоты раздражения нерва). Механизм этого явления заключается в суммировании следов возбуждения в нервно-мышечном синапсе.

Изучение процесса утомления изолированного нервно-мышечного препарата на практике осуществляется при сопоставлении «кривых утомления» двух мышц лягушки при ритмическом раздражении нервов. Один препарат — контрольный, второй — опытный; его предварительно обрабатывают каким-либо веществом, влияющим на обменные процессы или передачу в нервно-мышечном синапсе. При изучении влияния на процесс утомления нагрузки, повышения частоты, посттетанической потенциации и отдыха сравнивают проявления этих феноменов на различных стадиях «кривой утомления». Анализ процесса утомления возможно проводить на фоне применения временного повышения частоты раздражения — «феномена Беритова».

Цель работы. Зарегистрировать процесс утомления и выявить способы его временного снятия на изолированном нервно-мышечном препарате и на препарате с сохраненным кровотоком.

Задача 1. Анализ «кривой утомления» изолированного нервно-мышечного препарата при разных ритмах раздражения нерва

Методика. Используют препарат икроножная мышца — седалищный нерв. Готовят одновременно два препарата от одной лягушки.

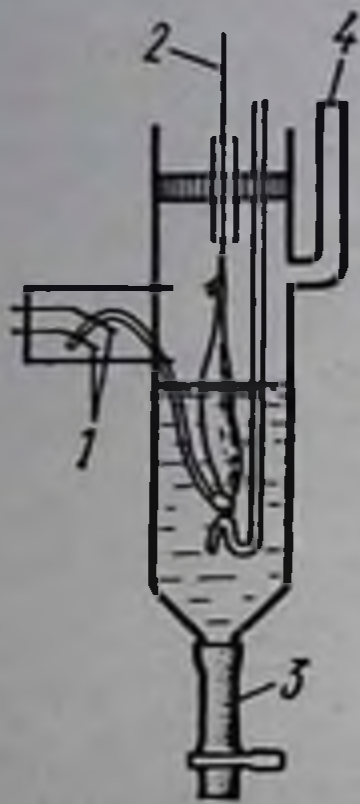


Рис. 69. Камера для регистрации утомления нервно-мышечного препарата:

1 — раздражающие электроды, 2 — лигатура, 3 — отросток камеры с резиновой трубкой и зажимом для удаления раствора Рингера во время опыта, 4 — отводная трубка для смены растворов

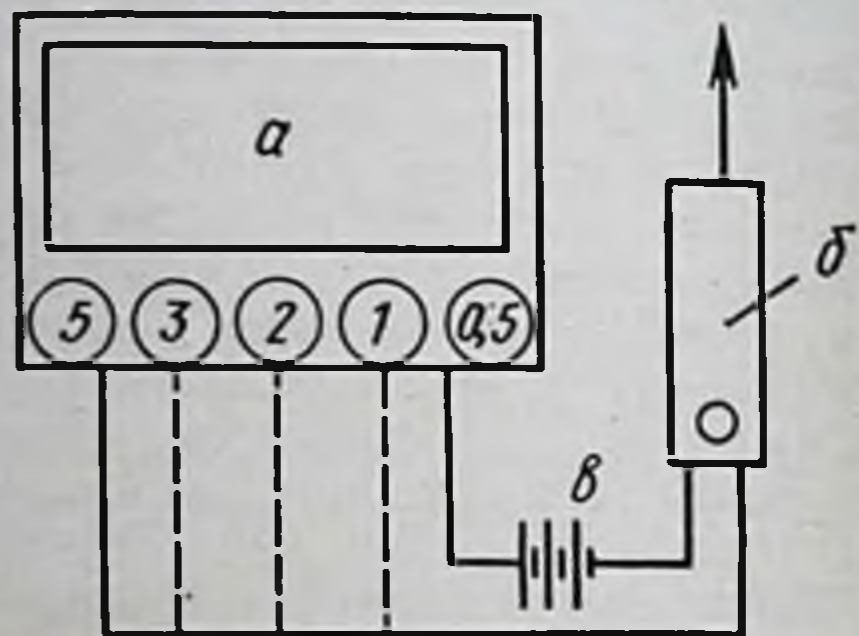


Рис. 70. Цепь для регистрации периодов тетанического раздражения:

а — прерыватель тока (0,5, 1, 2, 3, 5 имп/с), б — отметчик времени, в — аккумулятор с напряжением 3,5 В

Один из них помещают в стеклянную камеру, заполненную раствором Рингера (рис. 69): сухожильный конец мышцы закрепляют на нижнем конце стеклянного крючка, на втором конце завязывают лигатуру, соединенную с писчиком. Седалищный нерв выводят из отверстия камеры и помещают на раздражающие электроды. Перед началом каждого опыта камеру промывают и заполняют свежим раствором Рингера. Второй препарат находится в стакане с раствором Рингера. Для раздражения нерва используют стимулятор прямоугольных импульсов типа ЭСЛ-2 с изолирующим трансформатором, для регистрации — кимограф с удлинителем. В установку включают отметчик времени (рис. 70). Перед началом опыта проверяют работу кимографа, скорость вращения барабана кимографа (2—3 см/с), положение писчиков.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 0,5 имп/с, длительность 0,5 мс. На писчик поместить груз 5—10 г.

2. Подвести писчик к барабану кимографа и на неподвижном барабане определить максимальную силу раздражения. Число проб не должно превышать 3—4. После каждой пробы барабан кимографа передвигать от руки.

3. После 1—2 мин отдыха включить барабан кимографа и записать «кривую утомления» при найденной максимальной силе раздражения до полного прекращения сокращений мышцы.

4. Сменив раствор Рингера через нижний отросток камеры, поместить в нее второй препарат, определить максимальную силу раздражения и записать «кривую утомления» при частоте раздражения 1,5 имп/с.

5. Отметить на кимограммах дату, номер опыта, время, величину пороговой и максимальной сил раздражения, частоту стимулов и нагрузку. Для расчета фактически действующей нагрузки измерить соотношение плеч рычага. Зафиксировать кимограмму.

Обработка результатов. Характер развивающегося утомления определяют по скорости развития на «кривой утомления» «лестницы», «контрактуры», «быстрого и медленного спадов», по скорости падения высот сокращений мышцы до 75, 50 и 10% от максимальной величины сокращений во время «плато». При проведении нескольких опытов в одних и тех же условиях, с одной и той же частотой и нагрузкой строят графики по средним величинам. При значительном расхождении результатов строят графики для каждого опыта отдельно и дают объяснения такому расхождению.

З а д а ч а 2. Нахождение оптимума нагрузки и подсчет суммарной работы нервно-мышечного препарата

Методика. Используют нервно-мышечный препарат: икроножная мышца — седалищный нерв. Готовят одновременно 6—8 препаратов. Из каждой пары препаратов, выделенных от одной лягушки, на одном проводят опыт с нагрузкой 10 г, на другом — с нагрузками 20, 30, 50 и 70 г. Все опыты проводят при частоте раздражения 1 имп/с. В задаче используют методические приемы, камеру и оборудование, описанные в задаче 1.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 1 имп/с при длительности 0,5 мс; груз 10 г.

2. Подвести писчики к барабану кимографа и на неподвижном барабане определить максимальную силу раздражения для каждого препарата.

3. После 1—2 мин отдыха включить барабан кимографа (скорость 2—3 см/с) и записать «кривую утомления» при максимальной силе раздражения.

4. Сменив раствор Рингера, поместить в камеру второй препарат от того же животного, определить максимальную силу раздражения и записать «кривую утомления» при нагрузке 20 г. Повторить опыты со следующими парами препаратов, каждый раз изменяя нагрузку для одного из них и оставляя нагрузку 10 г для другого.

5. Отметить на кимограммах дату, номер опыта, величину порога и максимальной силы раздражения, частоту стимулов и нагрузку. Измерить соотношение плеч писчика (рис. 71, А), что необходимо для расчета фактически действующей нагрузки.

Обработка результатов. Величину суммарной работы W подсчитывают по формуле $W = PH$, где P — истинный груз, поднимаемый мышцей, г, H — сумма высот сокращений за время работы, см. Чтобы груз, навешиваемый на писчик, был равен истинной нагрузке P , действующей на мышцу, необходимо, чтобы плечи L_3 и L_4 писчика были равны по длине, а плечи L_1 и L_2 — по весу (рис. 71, А). Сумма высот сокращений вычисляется по формуле $H = h_1 n L$, где h_1 — средняя высота сокращений, n — число сокращений, записанное на 1 см длины миограммы, L — длина миографической записи (см), $h = S/L$, где S — площадь миограммы (см²). Чтобы вычислить S , необходимо перевести контур миограммы на миллиметровую бумагу. Подставив значение h_1 из последнего равенства в предыдущее, получают формулу $H = Sn$. Поскольку на барабане кимографа записывается амплитуда сокращений, увеличенная длиной писчика, для получения суммы истинных высот сокращений следует уменьшить их в L_1/L_4 раз. Тогда $H = Sn(L_1/L_4)$, а суммарная работа мышцы равна $W = PSn(L_1/L_4)$.

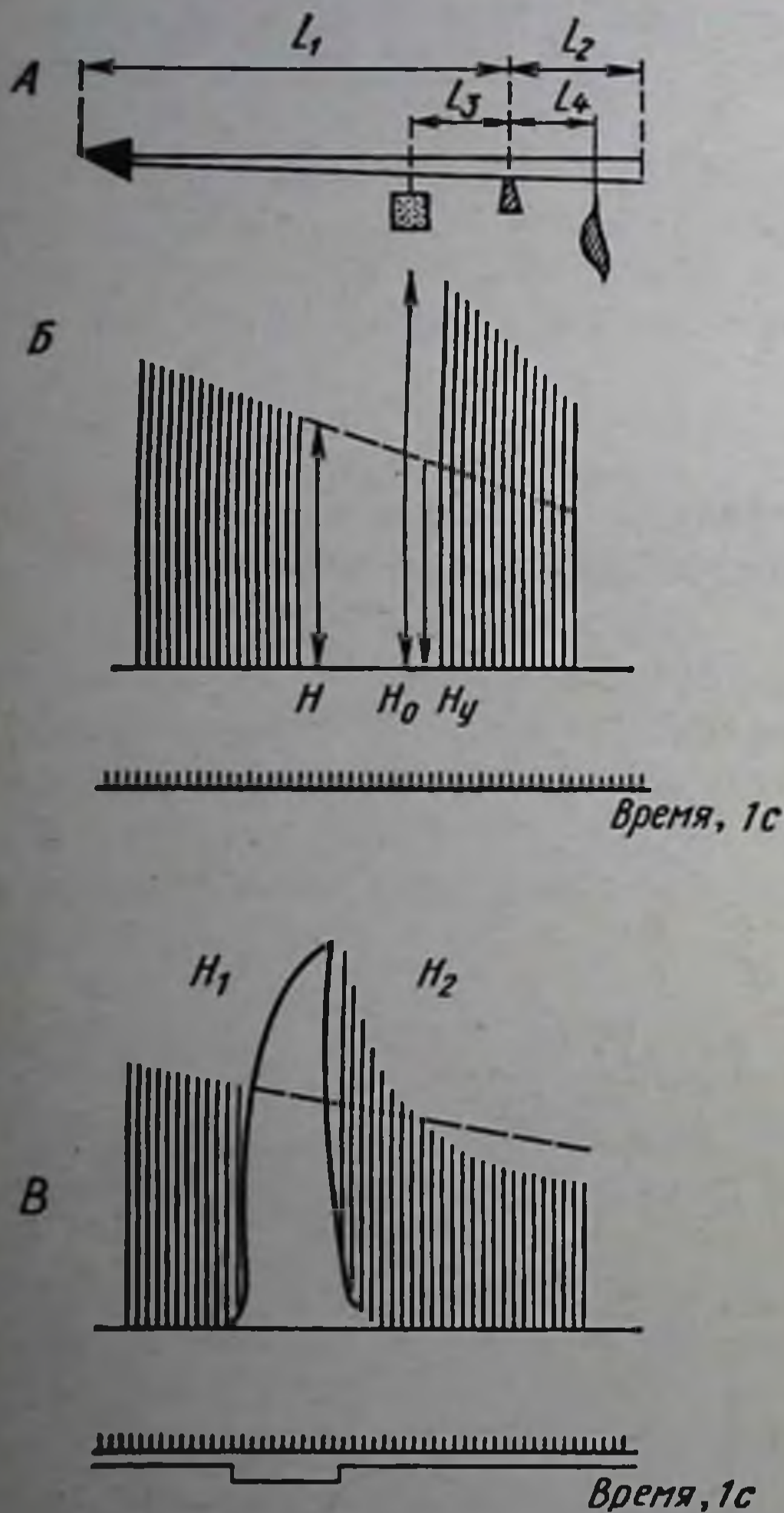


Рис. 71. Схема для обработки полученных результатов. А — соотношение плеч рычага для расчета фактической нагрузки (объяснение см. в тексте); Б, В — фрагменты записи одиночных сокращений для расчета эффектов «отдыха» и посттетанической потенции

Задача 3. «Эффект отдыха» при кратковременных перерывах в работе

Методика. Используют препарат, установку и оборудование, описанные в задаче 1. Проводят два опыта на изолированных препаратах от одной лягушки в одинаковых условиях опыта.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 1 имп/с, длительность стимула 0,5 мс; нагрузка на писчике — 10 г.

2. Определить максимальную силу раздражения.

3. После 1—2 мин отдыха записать «кривую утомления», включая через равные промежутки времени (рис. 71, Б) стимулятор на 10—20 с. «Эффект отдыха» должен быть приурочен ко всем стадиям «кривой утомле-

ния». На каждой стадии следует применить не менее 3—4 проб. На кимограмме сделать те же отметки, что в задаче 1.

Обработка результатов. На кимограмме после фиксации карандашом отмечают предполагаемый ход «кривой утомления», если бы не было перерывов в работе мышцы. Высоты сокращений H , H_0 и H_y (рис. 71, Б) измеряют и результаты приводят в таблице. Зная отношение высоты сокращения, развиваемого в первый момент после отдыха H_0 , к высоте сокращения, которое было бы в этот момент, если бы не было отдыха H_y , строят график изменений показателя «эффекта отдыха» во времени, отражающий зависимость его от степени утомления препарата. Строят график изменений высоты сокращений мышцы H в процентах от максимальной величины.

Т а б л и ц а. «Эффект отдыха» в разные периоды утомления нервно-мышечного аппарата

Номер эффекта		1	2	3
Время от начала раздражения, с		20	40	60
Высота сокращений, % от максимальной	Последнее сокращение до отдыха, H			
	Первое сокращение после отдыха, H_0			
	Предполагаемое экстраполированное сокращение на тот же момент без отдыха по «кривой утомления», H_y			
	Условный показатель «эффекта отдыха», H_0/H_y			

З а д а ч а 4. Влияние посттетанической потенциации в разные периоды развивающегося утомления

Методика. В задаче используют препарат, оборудование и установку, описанные в задаче 1. Опыты на двух препаратах, выпрепарованных у одной лягушки, проводят в одинаковых условиях.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 1 имп/с, длительность — 0,5 мс, определить максимальную силу раздражения. Нагрузка — 10 г.

2. После 1—2 мин отдыха записать «кривую утомления», через равные промежутки времени заменяя одиночные стимулы раздражениями с частотой 10—20 имп/с (1—2 с). Такие пробы следует применять на всех стадиях утомления по 3—4 раза. Длительность тетанусов должна быть одинаковой.

Обработка результатов. Сравнивают высоту сокращения мышцы на одиночные раздражения до H_1 и после H_2 тетанического раздражения и строят график, показывающий соотношение H_2/H_1 для разных стадий «кривой утомления» (рис. 71, В). По результатам измерений высот сокращений мышцы до и после тетанического раздражения составляют таблицу.

Т а б л и ц а. Явление «посттетанической потенциации» в процессе утомления нервно-мышечного препарата

Номер эффекта	1	2	3	и т. д.
Высота сокращений до тетанического раздражения, % от максимального H_1				
Высота наибольшего сокращения после тетанического раздражения, % от максимального H_2				
Показатель эффекта потенциации H_2/H_1				

З а д а ч а 5. Утомление препарата *in situ* в норме и при нарушении кровотока

Методика. Опыт проводят на интактной лягушке. Препаровку ведут под эфирным наркозом, привязав бинтом лягушку к пластинке. Вскрывают кожу над сухожилием икроножной мышцы, отсекают его как можно дальше от голеностопного сустава и привязывают к сухожилию лигатуру. Второй конец лигатуры укрепляют на вертикальном отростке писчика (для крепления лигатуры можно использовать миограф Крисса). На тыльной стороне бедра по средней линии делают кожный разрез длиной 1 см. Стеклянными крючками рассепаровывают мышцу и подводят две лигатуры под седалищный нерв и одну — под кровеносный сосуд *v. profunda femoris posterior*. Одной лигатурой перевязывают нерв как можно ближе к тазобедренному суставу. Вторая лигатура необходима для подведения игольчатых раздражающих электродов под седалищный нерв. Лигатурой на кровеносном сосуде приподнимают его для наложения зажима, прекращающего кровоток. Используют установку, описанную в задаче 1, но вместо стеклянной камеры в держателе универсального штатива закрепляют корковую пластинку с привязанной лягушкой и для регистрации сокращений мышцы используют писчик с вертикальным отростком или, что более удобно, миограф Крисса.

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 1—2 имп/с при длительности стимула 0,5 мс.

2. Приподнять с помощью лигатуры нерв и подвести под него игольчатые электроды.

3. Подвести писчик к барабану кимографа и на неподвижном барабане определить максимальную силу раздражения.

4. Включить кимограф и записать «кривую утомления» при сверх-максимальной силе раздражения нерва. Через 3—4 мин с помощью серфина зажать сосуд на 1,5—2 мин, не прекращая записи «кривой утомления». Остановку кровотока повторить 4—5 раз.

При наличии миографа Крисса можно одновременно записать «кривые утомления» на двух лапках лягушки. В установку ввести второй стимулятор и, раздражая оба седалищных нерва, на одной лапке записать «кривую утомления» мышцы с сохраненным кровотоком, а на второй — после его прекращения.

Обработка результатов. Сравнивают развитие процесса утомления на изолированном нервно-мышечном препарате и на препарате *in situ*. Описывают, какие стадии «кривой утомления» являются общими, а какие наблюдаются только в определенных условиях опыта. Сравнивают развитие утомления в мышце с сохраненным кровотоком и после пережатия сосуда.

Рекомендуемая литература: [47] — с. 278—346; [5] — с. 80—84. 228—251, 258—268; [18] — с. 3—241.

ФИЗИОЛОГИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

В учебной лаборатории в опытах на животных студент должен получить не только навык работы, но и представление об информативности имеющихся в настоящее время показателей функции головного и спинного мозга, об ограничениях, присущих различным методам исследования. Ярким примером этого положения является история электроэнцефалографии как метода объективной оценки деятельности различных мозговых образований в норме и при патологии. Другие классические приемы исследования — электростимуляция, разрушение тех или иных структур применяются в настоящее время со значительным усовершенствованием. Разработаны контроли, микрофизиологические приемы исследования, сочетающиеся с нейрохимическими и нейрофармакологическими методами, с анализом поведенческих реакций, проявления памяти и психических процессов.

Любое исследование головного и спинного мозга невозможно без соответствующей подготовки в области их анатомии. Поэтому в каждой задаче даны морфофизиологические обоснования, а студент может быть допущен к выполнению задачи только после сдачи предварительного зачета по анатомии изучаемых структур мозга. Студент также должен провести эксперимент с максимальным соблюдением гуманности и заботливого отношения к экспериментальному животному, начиная от содержания его в виварии, введения наркоза и до проведения эксперимента. Это требование необходимо соблюдать вдвойне, если опыт проводится без применения наркоза.

При изучении деятельности ЦНС следует соблюдать принцип постепенного перехода от простого к сложному. Первоначально необходимо ознакомиться с хорошо изученными явлениями, имеющими четкое объяснение с анатомической и физиологической точек зрения. Позднее можно предложить экспериментальную задачу, объяснение результатов которой и сейчас вызывает в науке дискуссию. Так, на практикуме сохранен традиционный принцип ознакомления с основными закономерностями деятельности ЦНС первоначально на примере двигательных регуляций. Анализ рефлекторной деятельности на уровне спинного мозга, выполненный на клеточном уровне, позволил глубже проникнуть в природу таких явлений, как торможение, антагонизм и синергизм возбуждений, позволил понять те закономерности осуществления двигательных рефлекторных актов, которые были открыты И. М. Сеченовым, Н. Е. Введенским, Ч. Шеррингтоном, А. А. Ухтомским, И. С. Беритовым. Представляется правильным начать изучение деятельности ЦНС с исследования классического явления — реципрокных отношений для мотонейронов, иннервирующих мышцы-антагонисты, с выявления координации ответов мышц-антагонистов в зависимости от источника афферентации и характера движения.

Важно отметить, что у млекопитающих, по сравнению с другими позвоночными, развился совершенно новый локомоторный аппарат, однако применяемые внутриклеточные исследования нейронов показывают общность физиологических механизмов, на которых строится координационный механизм и низших (тема I), и высших позвоночных (темы II и III).

Задачи тем I—IV доказывают роль мотонейронов как конечного звена в двигательных регуляциях и структур, к которым по моно- или полисинаптическим путям сходятся сигналы, реализующиеся в двигательный акт или напряжение мышц, определяющих тонус. Контроль за двигательной активностью и деятельностью спинальных рефлексов осуществляется по четырем системам путей: кор-

тикоспинальной, руброспинальной, ретикулоспинальной и вестибулоспинальной. У высших позвоночных они выходят на передний план, оставляя на второстепенных ролях тектоспинальную и интерстициоспинальную. Чтобы понять, как работают эти системы в целом, особенно при произвольных движениях, необходимо исследовать: какие анатомические связи устанавливают определенные нисходящие системы с мотонейронами спинного мозга и в каких отделах серого вещества спинного мозга происходит обработка этих сигналов.

Моделирование определенных поражений мозговых структур, ответственных за супраспинальные регуляции, актуально и сейчас. Поэтому в качестве «начал» физиологии движений предложена задача по раздражению моторной коры, изучение явления децеребрационной ригидности и изучение последствий экстирпации мозжечка. В опытах на животных стереотаксический метод позволяет одновременно раздражать или выключать определенные ядра мозга, регистрировать активность разных структур при поведенческих реакциях, влиять на биологические мотивации. В предлагаемых задачах используют только макроэлектроды. Применение стеклянных или металлических микроэлектродов для записи активности отдельных клеток подкорковых структур требует тех же навыков в работе и еще более жесткой фиксации головы животного в стереотаксическом приборе. Основная цель этой задачи — освоение методических навыков. Задача по деафферентации медиобазального гипоталамуса (по методу Б. Холаса) позволяет привлечь внимание студентов к сложным проблемам нейроэндокринологии, связанным с регулирующим влиянием статинов и либеринов, секретруемых в медиобазальной части гипоталамуса. В данном случае студент должен освоить хронический эксперимент, включающий в себя выхаживание и наблюдение за животным в течение 4—6 недель.

Поскольку задачи по физиологии ЦНС выполняются группами студентов по 3—5 человек и имеющаяся аппаратура не всегда позволяет проводить фронтальные занятия, целесообразно, чтобы по некоторым темам одновременно выполнялись различные задачи, а результаты обсуждались на семинарских занятиях всей группы.

ТЕМА I. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КООРДИНИРОВАННОЙ ИННЕРВАЦИИ МЫШЦ (ПО И. С. БЕРИТОВУ)

Спинной мозг лягушки — классический объект исследования координации рефлекторных актов. Анатомические и электрофизиологические сведения позволяют приблизиться к пониманию рефлекторной деятельности спинного мозга и принципов координации рефлекторных ответов. Рефлекторные акты — основа защитных реакций лягушки. Они могут быть вызваны с любого участка кожи, однако полученные при этом реакции неодинаковы. Каждый тип рефлекса имеет определенную воспринимающую поверхность. Так, на задней лапке лягушки можно вызвать следующие защитные рефлексы: *рефлекс*

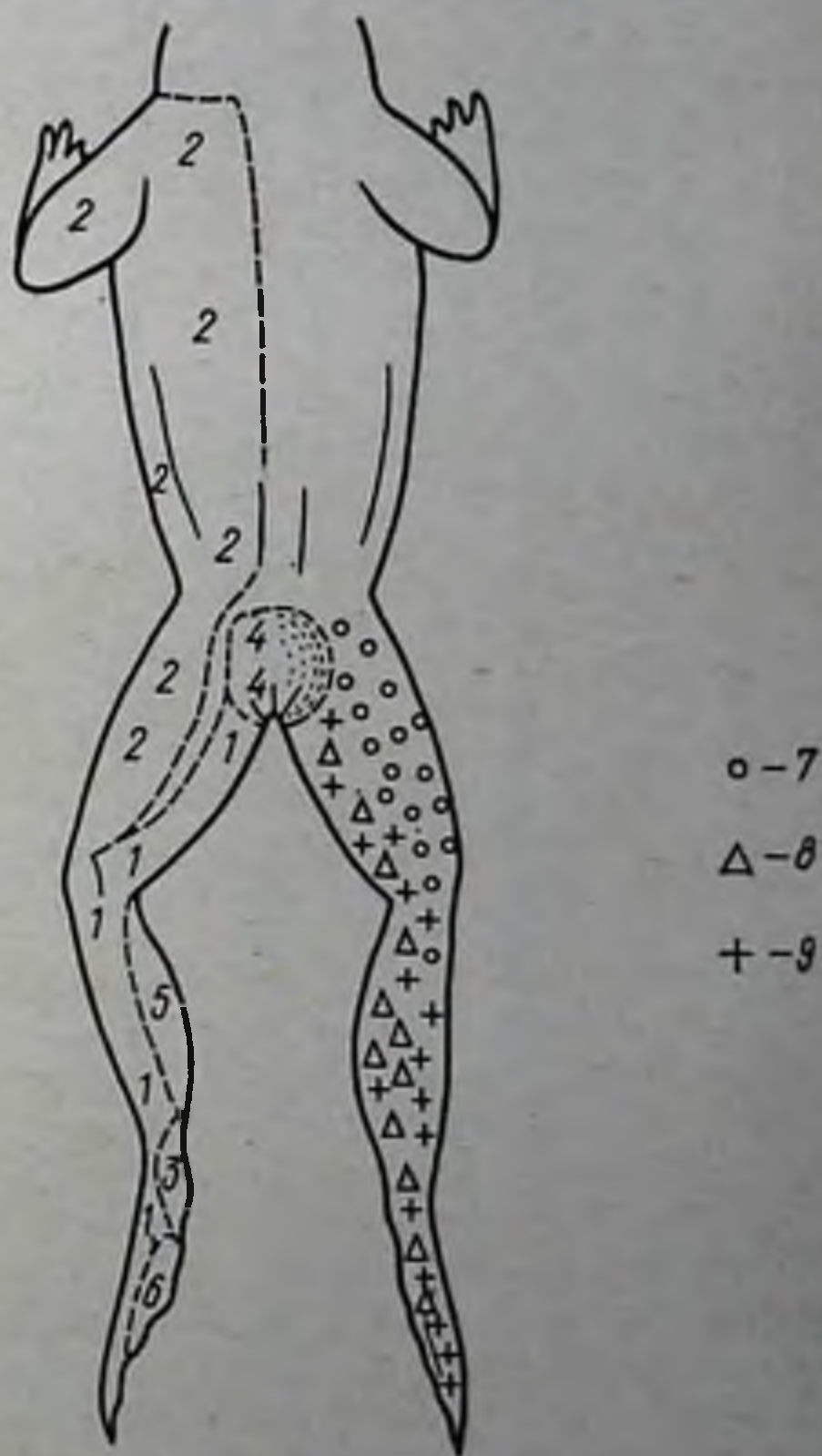


Рис. 72. Препарат спинно-мозговой лягушки (по И. С. Беритову, 1967):

1—6 — рецептивные поля (РП) рефлекса сгибания (1), рефлекса потирания разных типов, (2, 3, 4), рефлекса разгибания (5, 6), 7, 8, 9 — анатомическая проекция РП на коже

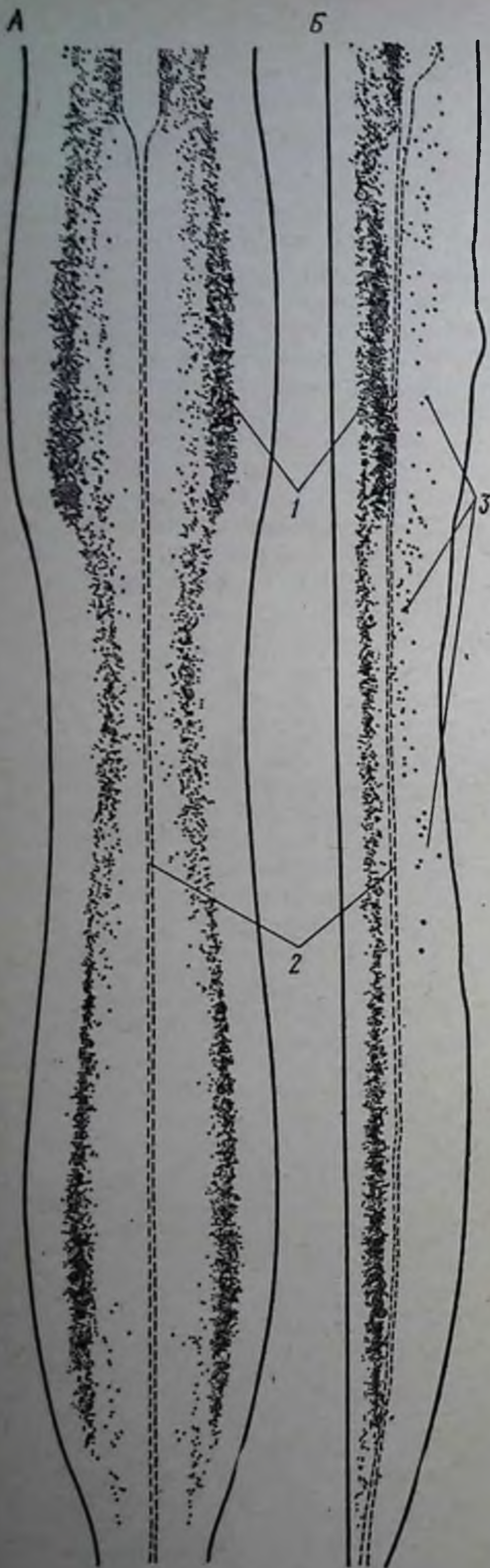


Рис. 73. Расположение мотонейронов на горизонтальном (А) и сагиттальном (Б) срезах спинного мозга лягушки *Rana pipiens* от IV желудочка до *filum terminale* (по М. Silver, 1942):

1 — мотонейроны, 2 — спинно-мозговой канал, 3 — большие клетки заднего рога

сгибания, наступающий при раздражении кожи на голени и стопе; рефлекс потирания, вызываемый с наружной поверхности бедра, боков туловища, спины и передних лап, области анального отверстия; при раздражении кожи над ахилловым сухожилием; рефлекс разгибания, возникающий при раздражении голени и ступни противоположной задней лапы (рис. 72). Изучение иррадиации возбуждений при защитных реакциях помогает понять роль межсегментарных связей спинного мозга.

Для спинного мозга лягушки используют нумерацию корешков по Эккеру: первая пара корешков считается второй — II шейные (у эмбриона существует две пары шейных корешков, но верхняя пара атрофируется); III и IV — плечевые, V—VII — грудные, VIII—X — поясничные, XI — крестцовые. По всей длине спинного мозга *Rana pipiens*, начиная с боковой стенки IV желудочка и включая большую часть ядра языкоглоточного нерва, насчитывается с каждой стороны спинного мозга по 3924—3932 мотонейронов (М. Silver, 1942). На рис. 73, А хорошо видно скопление нейронов в области ядра п. hypoglossus и в области плечевого пояса. Мотонейроны плечевого сплетения образуют латерально расположенные столбы нервных клеток. Медиальные столбы более диффузны. В поясничном отделе (рис. 73, Б) отсутствуют медиальные столбы мотонейронов. Они выявляются в каудальном отделе и служат координационным аппаратом хвостовой мускулатуры, исчезающей при метаморфозе. Сильно выражены латеральные столбы мотонейронов — координационный аппарат движения задних конечностей.

О характере дискриминации и координации двигательных актов передних и задних конечностей лягушки говорят следующие цифры: в плечевом отделе расположено примерно 52—56% мотонейронов, в грудном — 10—12, в поясничном — 34—39%. Функциональную организацию медиальных и латеральных столбов клеток выявляют при раздражении микроэлектродом, введенным в различные участки спинного мозга: латеральные столбы содержат клетки, иннервирующие мускулатуру ко-

нечностей, медиальные — клетки, иннервирующие осевую мускулатуру. Мотонейроны, иннервирующие мышцы-сгибатели, расположены краинальнее, чем мотонейроны мышц-разгибателей, а мотонейроны, иннервирующие мышцы-аддукторы, расположены краинальнее клеток, иннервирующих мышцы-абдукторы. Мотонейроны расположены компактными группами и имеют большую величину: до 50—70 мкм в длину и 25 мкм в ширину. Дендриты мотонейронов заходят в белое вещество (рис. 74). Промежуточные нейроны имеют меньшие размеры клеточных тел, расположены по всей массе серого вещества и не образуют четко очерченных групп.

Организация и расположение мотонейронов спинного мозга лягушки представляет интерес с филогенетической точки зрения. У лягушки впервые мотонейроны ясно отграничиваются в группы в вентральных рогах серого вещества. Метамерия отсутствует и мотонейроны посылают свои аксоны в краинально и каудально расположенные передние корешки. Применение различных модификаций метода Гольджи позволило выявить особенности строения дендритов и характер ветвления аксонов в нейропиле спинного мозга лягушки (рис. 75). Значительной длины достигают дендриты мотонейронов, ветвящиеся в белом веществе и в перимедуллярном слое (рис. 75, А). Важной особенностью является ветвление дендритов в росто-каудальном направлении и распространение их до 1 мм. Такая ориентация дендритов характерна только для мотонейронов спинного мозга (рис. 75, Б). В промежуточной зоне серого вещества находятся вставочные нейроны, дендриты которых ориентированы горизонтально и также достигают белого вещества и перимедуллярного скопления (рис. 75, А, 3). Аксоны некоторых клеток имеют коллатерали, достигающие сомы мотонейронов (рис. 75, Б, 11), тогда как основное их направление прослеживается в белом веществе. Аксоны других промежуточных нейронов проникают в перимедуллярное сплетение или переходят на противоположную половину спинного мозга по вентральной коммисуре.

Мелкие клетки задних рогов серого вещества имеют короткие дендриты, ветвящиеся не доходя канатиков белого вещества. Входящие афферентные волокна из задних корешков образуют здесь сложный комплекс ветвлений (рис. 75, А, 5; В).

Моносинаптическое возбуждение мотонейронов спинного мозга амфибий при раздражении волокон задних корешков вызывает возникновение возбуждающего постсинаптического потенциала, ВПСП, который никогда не достигает уровня, приводящего к разряду нейрона. Следовательно, волокна задних корешков не проникают в спинной мозг глубже задних рогов и промежуточного серого вещества, и моносинаптическая активация мотонейронов может осуществляться через отдаленные ветви дендритов.

В межсегментарной координации спинного мозга лягушки большую роль, помимо интраспинальной системы, играют афферентные волокна, коллатерали которых доходят до вышележащих и нижележащих сегментов спинного мозга (рис. 76). Заднекорешковые волокна у амфибий и их коллатерали заходят в глубь серого вещества, но никогда не встречаются в вентральном роге серого вещества. Большое значение имеет межсегментарное распределение коллатералей первичных афферентов для понимания межсегментарной координации: ста-

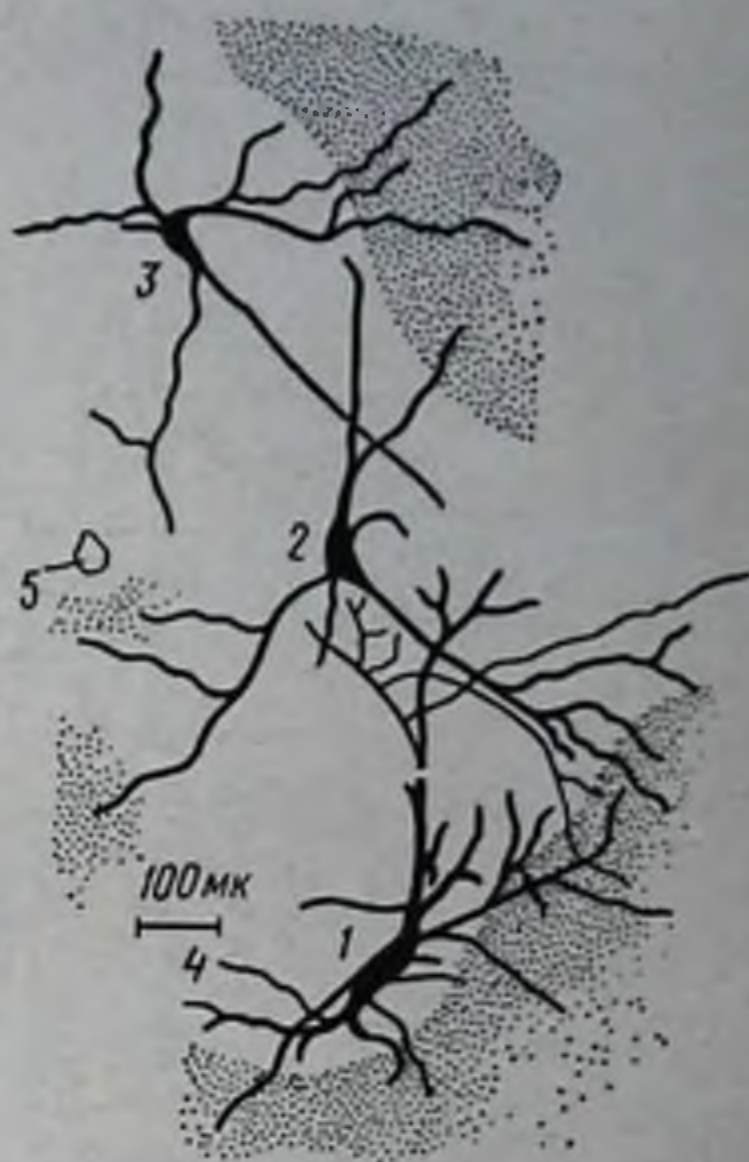


Рис. 74. Нейроны спинного мозга лягушки (метод Гольджи, поперечный срез):

1 — мотонейрон, 2 — интернейрон, 3 — нейрон заднего рога, 4 — аксон, 5 — центральный канал спинного мозга

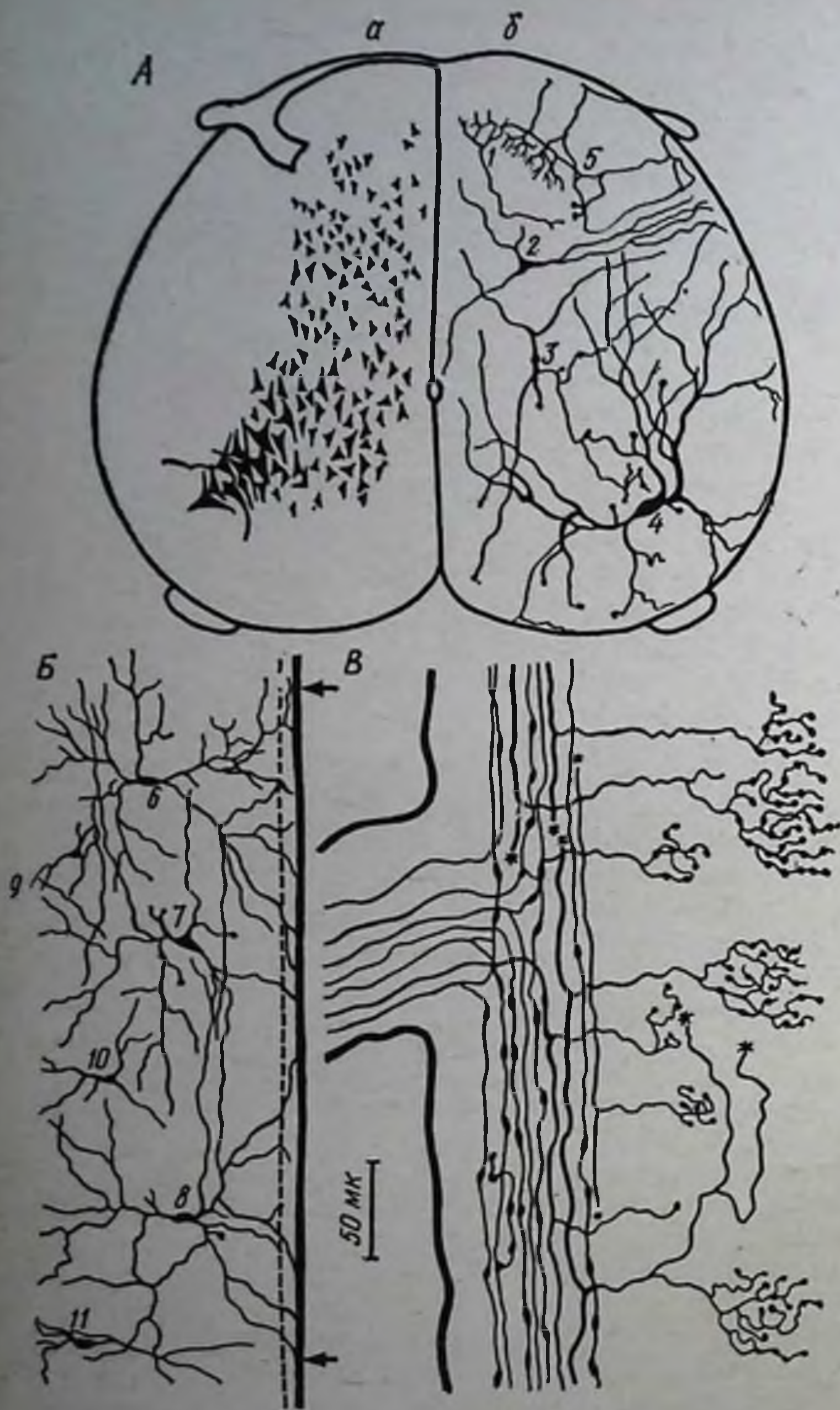


Рис. 75. Организация нейропиля спинного мозга взрослой жабы *Bufo arenarum*. А — поперечный срез в области поясничного сегмента; Б, В — продольные срезы в области переднего рога и входа заднего корешка (по L. Stensaas, S. Stensaas, 1971):

α — тела нейронов с препаратов по Бодлану, β — нейронное строение и направление ветвления дендритов с препаратов по Гольджи дорсального рога (1), промежуточной зоны (2, 3) и переднего рога (4) серого вещества, б — ветвление коллатералей волокон задних корешков, 6, 7, 8 — ростральное и каудальное направление дендритов мотонейронов, 9, 10, 11 — промежуточные нейроны; пунктиром отделена зона перимедуллярного сплетения, черными стрелками ориентировочно указан уровень корешков, звездочками — волокна, продолжающиеся в направлении, перпендикулярном плану среза

новится понятным, почему заднекорешковый ВПСП никогда не достигает критического уровня, необходимого для возбуждения мотонейрона. Амплитуда такого ВПСП и крутизна нарастания меньше, чем у ВПСП, вызванных раздражением боковых столбов. Последние легко вызывают разряд мотонейрона. Это объясняется тем, что заднекорешковые волокна контактируют с дистальными отделами дендритов, в то время как коллатерали, входящие в серое вещество из боковых столбов, активируют проксимальные дендриты и тело клетки. Однако существуют противоположные факты: зарегистрирована моносинаптическая активация мотонейронов грудного отдела спинного мозга жабы с мышечных афферентов. Таким образом, вопрос о характере синаптической активации мотонейронов спинного мозга является чрезвычайно сложным; он детально рассмотрен в работах Дж. Экклса (1966), Р. Гранита (1973) и П. Г. Костюка (1971, 1973).

Цель работы. Показать при регистрации флексорного рефлекса полусухожильной мышцы лягушки зависимость амплитуды рефлекторного ответа этой мышцы от силы афферентного раздражения при электрической стимуляции малоберцового нерва. Продемонстрировать на примере мышц-антагонистов бедра лягушки характер взаимоотношений трехглавой и полусухожильной мышц в рефлекс потирания и флексорном

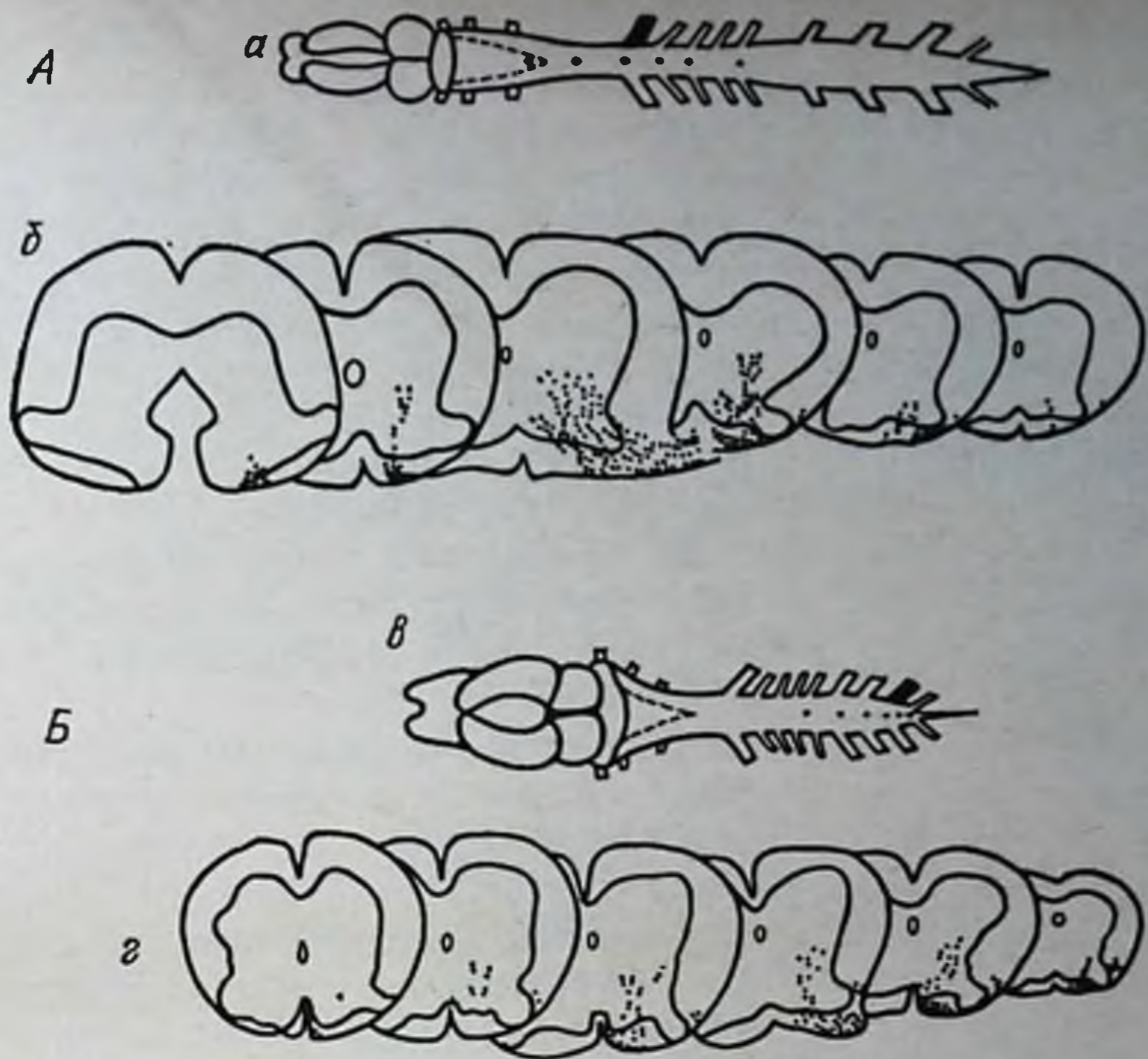


Рис. 76. Распределение афферентных волокон по сегментам спинного мозга жабы *Bufo marinus* (А) и лягушки *Rana lessonae* (Б) (по В. Joseph, D. Whitlock, 1968):

а, в — перерезка IX и II задних корешков (зачернены), точками показаны уровни представленных срезов (б, г), пунктиром — положение дегенерирующих терминалей

рефлексе. Выявить физиологическую природу перестройки возбуждений для совокупности мотонейронов, иннервирующих каждую из двух антагонистических мышц в зависимости от источника афферентации (рецептивного поля) и от характера рефлекторно вызванного движения.

Задача 1. Градация рефлекторного ответа

Методика. Объектом исследования служит таламическая лягушка. Перерезку головного мозга делают за 1 ч до начала опыта. Лягушку помещают на корковую пластинку брюшком вверх, привязывают бинтом и делают кожный разрез над голеностопным суставом. Находят сухожилие полусухожильной мышцы, которое имеет характерную форму крепления — сухожильный треугольник на голени (рис. 77). Сухожилие берут на лигатуру, при этом важно не повредить мышечные волокна и не захватить сухожилия других мышц. Ниже лигатуры сухожилие отсекают от кости. С наружной стороны лапки мышцы (передняя длинная большеберцовая и передняя короткая большеберцовая) раздвигают с помощью стеклянного крючка и берут на лигатуру малоберцовый нерв. Необходимо следить, чтобы нерв не подсыхал на электродах.

Установка включает стимулятор типа ЭСЛ-1 или ЭСЛ-2, кимограф с удлинителем, универсальный штатив, миограф Крисса с одним пишущим, отметчик раздражения, аккумулятор и раздражающие металлические электроды. Нагрузка на мышцу должна составлять 5—10 г. Скорость движения барабана кимографа 5—10 мм/с. Интервалы между раздражениями должны быть не менее 3—5 мин.

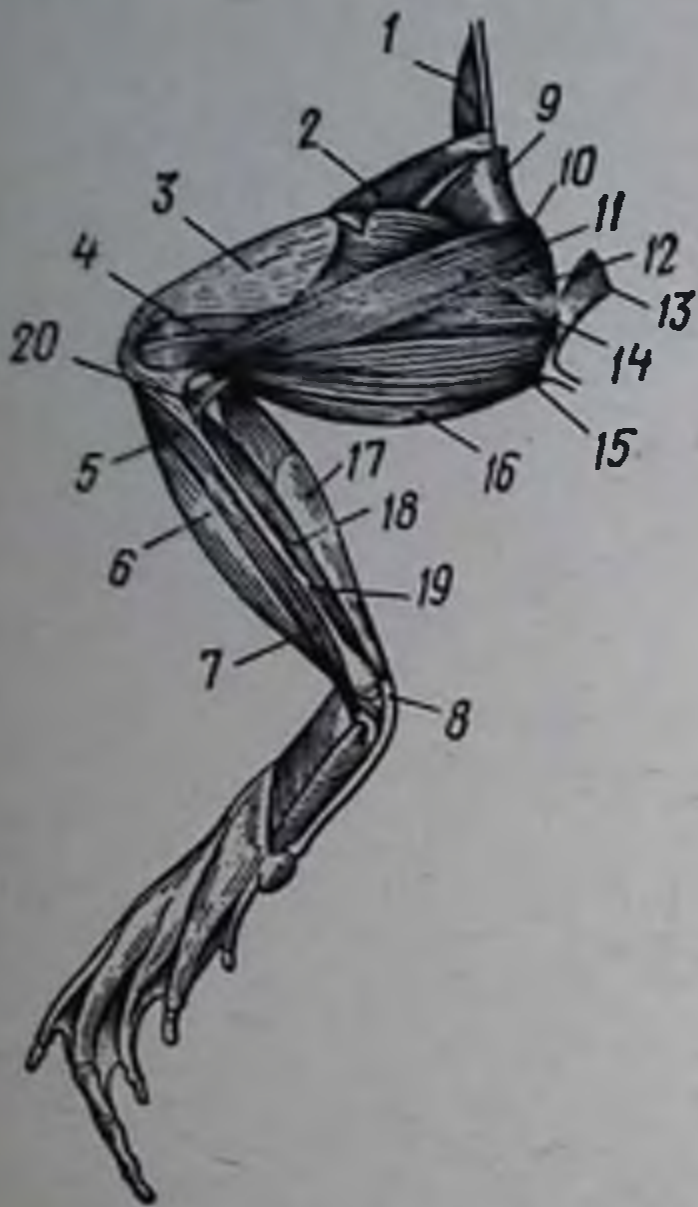


Рис. 77. Мускулатура правой задней конечности лягушки (по П. В. Терентьеву, 1950):

1 — *m. iliacus externus* (*gluteus*), 2, 3 — *m. triceps* (2 — *m. tensor fasciae latae*, 3 — *m. cruralis*), 4, 14 — *m. adductor magnus*, 5 — *m. extensor cruris brevis*, 6, 7 — *m. tibialis anticus longus et brevis*, 8 — ахиллово сухожилие, 9 — *m. iliopsoas*, 10 — *m. adductor longus*, 11 — *m. sartorius*, 12 — *m. pectineus*, 13 — *m. rectus abdominis*, 15, 16 — *m. gracilis* (*rectus internus*) *major et minor*, 17 — *m. gastrocnemius*, 18 — *m. tibialis posticus*, 19 — кость голени, 20 — сухожилие *m. semitendinosus*

Ход работы. 1. Установить на стимуляторе частоту раздражения 20—40 имп/с, длительность 0,5 мс.

2. Подвести под нерв электроды, включить кимограф и найти порог рефлекторного ответа. Кимограф остановить и сделать интервал 3—5 мин.

3. Увеличить силу раздражения, включить кимограф и зарегистрировать рефлекторный ответ на увеличенную силу раздражения.

Обработка результатов. При обсуждении полученных данных обращают внимание на изменение амплитуды, формы и продолжительности рефлекторных ответов, на явления последействия. Поскольку изменение рефлекторной реакции в зависимости от силы электрического раздражения афферентного нерва определяется рядом факторов, сопоставляют возможную роль количества возбужденных афферентных волокон; частоты афферентных сигналов; числа вставочных нейронов, участвующих в рефлексе; числа мотонейронов в ядре, иннервирующих данную мышцу; процесса пространственной суммации ВПСР на мотонейронах. При анализе эффекторного звена рефлекторной дуги оценивают, какую роль играет одновременное возбуждение мышечных единиц и

отдельных мышечных волокон, как это отражается на формировании рефлекторного ответа при адекватном раздражении рецепторов, при раздражении только чувствительного нерва, при раздражении задних корешков, при раздражении смешанного нерва.

Задача 2. Координация рефлекторных ответов

Методика. Объект исследования — спинальная лягушка, т. е. животное с исключением всех супраспинальных влияний. Децеребрацию проводят с помощью узкого глазного скальпеля, который вводят в область сочленения черепа с первым позвонком (закрытая децеребра-

ция — проводится под эфирным наркозом). Выпрепаровывают сухожильную и трехглавую мышцы. Для вызова рефлекторных реакций применяют стимуляцию нервов: малоберцового — п. peroneus, плечевого — п. brachialis, кожного — п. cutaneus femoralis lateralis, стимуляцию задних корешков и раздражение кожи при нанесении кислоты на переднюю конечность или на боковую поверхность тела той же стороны.

К установке, используемой в задаче 1, добавляют второй писчик в миографе Крисса и второй стимулятор с раздражающими электродами. Скорость вращения барабана увеличивают до 20 мм/с. Отлаживают работу двух отметчиков раздражения таким образом, чтобы концы всех писчиков находились на одной вертикальной линии. Это позволяет проконтролировать момент взаимного возбуждения и торможения исследуемых мышц. Работу можно выполнять в нескольких вариантах.

Ход работы. Вариант 1. Значение силы раздражения афферентного нерва

1. Спустя 1 ч после операции по децеребрации подвести раздражающие электроды под малоберцовый нерв.

2. Установить на стимуляторе частоту раздражения 20—40 имп/с, длительность стимула 0,5 мс и околопороговую силу раздражения, найденную в задаче 1.

3. Включить кимограф и нанести 1-е раздражение, после чего остановить кимограф и сделать перерыв 3—5 мин. Увеличить силу раздражающего стимула и повторить раздражение нерва.

Вариант 2. Торможение сгибателя при возбуждении антагониста, включающегося в рефлекс с другого сегмента спинного мозга

1. Спустя 1 ч после операции по децеребрации подвести раздражающие электроды под малоберцовый нерв, вторую пару — под плечевой или кожный нервы.

2. Установить на стимуляторах частоту раздражения 20—40 имп/с, длительность стимула 0,5 мс и околопороговую силу раздражения, найденную в задаче 1.

3. Включить кимограф, нанести раздражение на малоберцовый нерв, и в случае рефлекторных ответов мышц-антагонистов, не выключая стимуляцию малоберцового нерва, включить раздражение плечевого или кожного нервов на 2—3 с. Выключить раздражение плечевого (или кожного) нерва, прекратить раздражение малоберцового нерва, остановить кимограф. Через 3—5 мин повторить раздражения, изменяя силу раздражающего тока, поступающего на обе пары электродов.

4. В период раздражения малоберцового нерва поместить кусочек фильтровальной бумаги, смоченной 0,5%-ным раствором H_2SO_4 , на переднюю конечность или боковую поверхность тела той же стороны.

Вариант 3. Торможение разгибателя при одновременном рефлекторном включении сгибателя

1. Вскрыть спинно-мозговой канал, отпрепаровать и взять на лигатуру IX задний корешок. Подвести под него раздражающие электроды. Вторую пару электродов подвести под плечевой нерв.

2. Установить на стимуляторах частоту раздражения 20 имп/с, длительность стимула 0,5 мс, околопороговую силу раздражения, найденную в предыдущих опытах.

3. Раздражать IX корешок и регистрировать сокращение только полусухожильной мышцы или одновременное сокращение обеих мышц.

4. Раздражать плечевой нерв и регистрировать рефлекс потирания — сокращение трехглавой мышцы.

5. На фоне раздражения плечевого нерва через 1—2 с от начала рефлекса потирания включить раздражение IX заднего корешка, приводящее к торможению мотонейронов разгибателя. Прекратить раздражение корешка (это приведет к восстановлению рефлекса потирания), после этого прекратить раздражение плечевого нерва.

Вариант 4. Эффекты контралатеральных раздражений в рефлексе потирания

Выпрепаровать малоберцовые и плечевые нервы с обеих сторон. Чередую раздражения ипсилатерального и контралатерального нервов, отметить характер сокращения мышц-антагонистов при ипсилатеральном и контралатеральном возбуждении, в рефлексах сгибания и потирания.

Обработка результатов. При обсуждении полученных данных обращают внимание на то, что трехглавая мышца является разгибателем дистального и сгибателем проксимального суставов, а полусухожильная — сгибателем дистального и разгибателем проксимального суставов. Включение этих мышц в рефлекторные реакции неодинаково при разгибательных и сгибательных движениях. Возможно одновременное, синергическое возбуждение этих мышц, но тогда сокращение антагонистической мышцы всегда меньше по амплитуде, так как оно протекает на фоне торможения, вызванного в силу реципрокных отношений для мотонейронов данных мышц. Главное внимание уделяют составлению схем предполагаемых взаимоотношений рефлексов, межсегментных связей спинного мозга, расположению мотонейронов и промежуточных нейронов.

Рекомендуемая литература. [5] — с. 5—35, 48—76, рис. 37, с. 84, 89—103; [58] — с. 139—140, 154; [8] — с. 7; [66] — с. 5—51.

ТЕМА II. РЕЦИПРОКНАЯ ИННЕРВАЦИЯ МЫШЦ-АНТАГОНИСТОВ¹

Центры сгибательных и разгибательных рефлексов спинного мозга кошки являются классическим объектом исследования механизмов координации. Вызывать торможение мотонейронов определенной мышцы (например, разгибателя) можно, раздражая проприорецепторы мышцы-антагониста (сгибателя) или электрическим раздражением афферентных волокон, отходящих от них. Для разгибателя торможение вызывается всеми теми афферентными сигналами, которые стимулируют сгибательные рефлексы. Это прежде всего раздражение кожных рецепторов. Интенсивное тормозное влияние на разгибатель наблюдается с коры. Взаимоотношение процессов возбуждения и торможения для любой популя-

¹ В постановке задач тем II и III принимала участие канд. биол. наук Г. М. Баскакова.

ции мотонейронов определяется тем, какой сгибательный или разгибательный рефлекс вызывается раздражением рецептивного поля или чувствительного нерва.

Сгибательный рефлекс фазный. При длительных ритмических раздражениях афферентного нерва он ослабевает, а затем исчезает. Сгибательный рефлекс — полисинаптический, с временем задержки 3—5 мс. Его характеризует временная дисперсия импульсации на пути к мотонейрону. Временная и пространственная дисперсия сигналов создают длительную волнообразную синаптическую деполяризацию мотонейронов мышц-сгибателей.

Координация сгибательных рефлексов сложнее, чем координация собственно рефлексов мышц, что зависит от ряда факторов. Среди первых — *иррадиация* афферентных сигналов, приводящая к возбуждению мотонейронов различных сгибателей, которые взаимно подкрепляются по правилу реципрокности. Степень возбуждения сгибателей определяется также *фракционированием рефлексов* (Шеррингтон, 1969). Одновременно с возбуждением мотонейронов сгибателей в силу реципрокности возникает торможение разгибателей. Это влияние передается через тормозные промежуточные нейроны, вызывающие длительные постсинаптические потенциалы (ТПСП) в мотонейронах разгибателей (рис. 78, А—Д). Иррадиация афферентных сигналов, инициирующих сгибательный рефлекс, переходит на противоположную сторону спинного мозга, вызывая перекрестный разгибательный рефлекс и одновременное торможение одноименной мышцы-сгибателя. При одновременном раздражении афферентных одноименных нервов слева и справа наблюдается взаимное *контралатеральное торможение*. Нейронные механизмы этого торможения до конца еще не выяснены.

Для контралатерального торможения, вызванного одиночным стимулом, характерны большой латентный период, медленное достижение максимума (40—60 мс) и длительное течение (до 300 мс и более). Определенную роль в этом явлении играют вставочные нейроны и пресинаптическое торможение. При активации афферентов флексорного рефлекса возникают межнейронные взаимоотношения, не укладывающиеся в простые схемы: ипсилатеральная флексия — контралатеральная экстензия, так как при возбуждении афферентов флексорного рефлекса одной стороны спинного мозга на его противоположной стороне и мотонейроны сгибателей, и мотонейроны разгибателей испытывают ранние моносинаптические и поздние полисинаптические возбуждательные и тормозные постсинаптические влияния.

Интернейроны, участвующие в реципрокном торможении, вызывают моносинаптические ТПСП в тех мотонейронах, в которых раздражение *1а*-афферентов также вызывает ТПСП (после двойной синаптической задержки). Каждый промежуточный нейрон может вызывать торможение в пяти мотонейронах полусухожильной мышцы. Подавление флексорного рефлекса при классическом контралатеральном торможении является результатом торможения вслед за возбуждением в сегментарных вставочных нейронах при активации афферентов флексорного рефлекса. При стимуляции афферентов флексорного рефлекса одной стороны высокочастотный разряд с последующей тормозной фазой имеет место в большой группе вставочных нейронов на противоположной стороне (скрытый период варьирует от 2 до 40 мс, эффективное торможение наблюдается в среднем в течение 40 мс). Следовательно, через 40—60 мс после контралатерального торможения в большинстве вставочных нейронов (80—100%) на противоположной стороне будет развиваться торможение, препятствующее осуществлению ипсилатеральных рефлексов. Итак, контралатеральные афференты флексорного рефлекса включают сегментарные возбудимые и тормозные системы. Они на пути к мотонейрону усиливают или блокируют полисинаптические ипсилатеральные рефлекторные реакции, а в самих мотонейронах создают условия для моносинаптического облегчения или торможения. Сложность организации сегментарного контралатерального торможения объясняется характером временной организации протекания электрических процессов в каждом данном сегменте спинного мозга.

Возвратное торможение (рис. 78, Ж, Д) может оказывать существенное влияние на течение реципрокного торможения, поскольку при разных степенях сокращения мышцы уровень реципрокного отношения между нейронами антагонистов различен. При более общих движениях можно исключить реципрокное

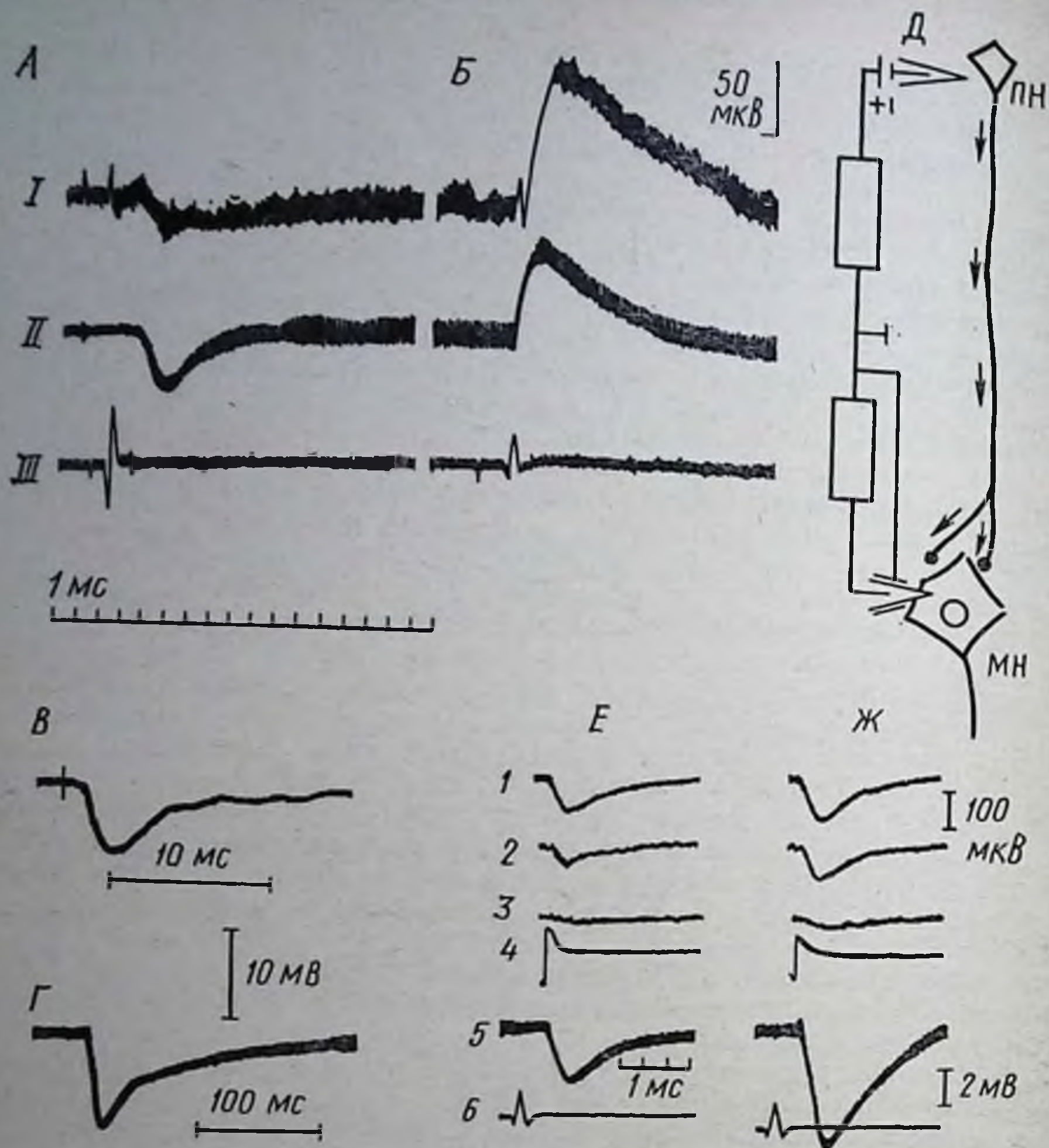


Рис. 78. Возбуждение и торможение мотонейронов спинного мозга. А, Б — реакции на раздражение волокон группы Ia нерва четырехглавой и нерва задней двуглавой полусухожильной мышц (по Дж. Экклсу, 1966); В, Г — ТПСР, регистрируемые в мотонейроне при раздражении проприоцептивных волокон группы Ia и афферентов сгибательного рефлекса (по П. Г. Костюку, 1958); Д — одновременная экстраклеточная регистрация нервных импульсов промежуточного нейрона (ПН), возбуждаемого микроионофоретически подведением глутамата, и внутриклеточная регистрация изменения мембранного потенциала мотонейрона (МН), тормозимого при возбуждении промежуточного нейрона (стрелками показано направление распространяющихся нервных импульсов); Е — усредненные записи ТПСР; Ж — то же, после деполяризации мембраны мотонейронов током 20 нА (по Е. Jankowska, W. Roberts, 1972): 1 — электротонический потенциал, зарегистрированный в передних корешках, II — ТПСР и ВПСР мотонейрона S₁ — сегмента, при внутриклеточной регистрации, III — ПД, зарегистрированный в задних корешках; 1, 2, 3 — ТПСР в трех мотонейронах, вызванные спайковой активностью ПН (4), 5 — ТПСР, вызванный тремя последовательными одиночными раздражениями Ia-афферентов нерва четырехглавой мышцы (6)

торможение. Спинальный и супраспинальный контроль клеток Реншоу приводит к усилению или ослаблению их сигналов, а следовательно, передача сигналов в системе возвратного торможения изменяет состояние мотонейронов и степень реципрокного торможения. Если для выполнения движения необходимо реципрокное торможение, передача в возвратном пути должна быть заторможена.

При выполнении работы особое внимание следует обратить на соотношение ипси- и контралатеральной стимуляции и по силе и по частоте раздражающих стимулов. Эффект контралатерального раздражения может быть различным в зависимости от того, в какой момент ипсилатеральной реакции оно наносится. Если раздражение контралатерального нерва применить на фоне ипсилатерального флексорного рефлекса, а об эффекте рефлекторного ответа судить по ПД нервов, подходящих к сгибателям левой и правой сторон, то можно определить оптимальные частоты для вызова контралатерального торможения — 100—200 имп/с. Контралатеральное торможение зависит от условий ипсилатерального раздражения, т. е. от интенсивности протекания сгибательного рефлекса. Наибольшее торможение ответов имеет место при относительно небольшой силе ипсилатерального раздражения и при значительной силе (в 30 раз выше пороговой) контралатерального раздражения.

Это подтверждает закономерности, выявленные в классических исследованиях Ч. Шеррингтона, Н. Е. Введенского, А. А. Ухтомского, заключающиеся в том, что взаимная инактивация в центрах возбуждающего и тормозного эффектов требует большей силы со стороны тормозящей системы.

Цель работы. Зарегистрировать в опытах на спинальной кошке с перерезкой на уровне 12-го грудного сегмента рефлекторные ответы для сгибателя и разгибателя коленного сустава. Выявить антагонистические отношения при ипсилатеральном и контралатеральном раздражениях чувствительного нерва. Показать контралатеральное торможение и антагонистические отношения при рефлекторном включении одноименных мышц задних конечностей. Зарегистрировать и определить характер разгибательных рефлексов. Изучить ритмические рефлексы спинного мозга. Сравнить антагонистические отношения мышц во флексорном рефлексе у децеребрированного и спинального животного.

Задача 1. Антагонистические отношения мышц сгибателя и разгибателя коленного сустава при ипси- и контралатеральных раздражениях чувствительного нерва

Методика. Перед началом работы необходимо ознакомиться с расположением мышц и нервов задней конечности кошки по препаратам, рисунку (рис. 79) и по книге А. Д. Ноздрачева (1973, рис. 43—45).

Животное готовят к опыту в одном из трех вариантов: а) производят высокую перерезку спинного мозга на уровне 12-го грудного сегмента — Th_{12} , опыт начинают спустя 2—3 ч после операции; б) животное берут в опыт спустя сутки после высокой перерезки спинного мозга; в) проводят высокую перерезку спинного мозга в стерильных условиях, животное выхаживают и опыт проводят через 7—14 дней после операции.

Задачи выполняют группой студентов из 3—4 человек. Каждый участник должен четко знать свои обязанности. Распределение обязанностей в группе: хирург, его помощник и наркотизатор, хирургическая сестра, физиолог, ответственный за стимулирующую и регистрирующую аппаратуру и ведение протокола опыта (необходимо чередоваться при переходе к другой задаче). Под-

готовка и проведение опытов с животными разрешается только в халате, шапочке или косынке на голове.

Рассмотрим общие приемы работы с кошкой. Экспериментальные животные должны пройти контроль у ветврача. Перед работой у животного определяют пол и массу (записывают в тетрадь). Для эфирного наркоза кошку сажают под стеклянный колпак, куда помещен ватный

тампон, смоченный эфиром. Это делают в предоперационной. Необходимо подробно провести наблюдение за поведением животного, установить фазы наркотического сна и записать свои наблюдения в тетрадь. Подробный отчет по исследованию влияния наркоза на животное прилагают в протоколе. В операционной после фиксации животного на столе наркоз подают через маску, а после трахеотомии — через трубку. Дополнительно при необходимости кошке вводят внутрибрюшинно раствор нембутала из расчета 30 мг/кг массы животного.

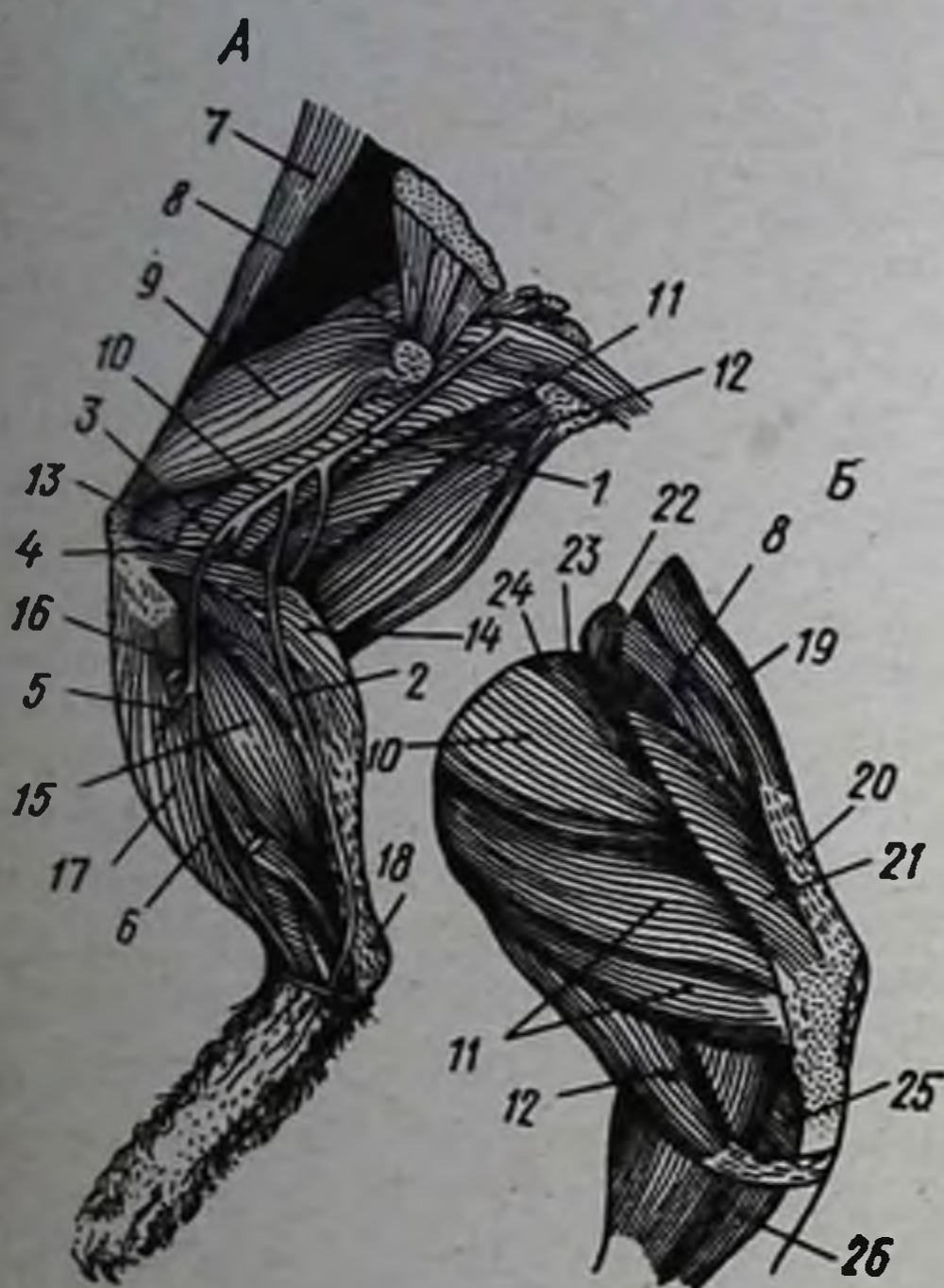


Рис. 79. Мышцы и нервы задней конечности кошки. А — латеральная сторона с ветвлением седалищного нерва; Б — второй слой мышц медиальной стороны бедра:

1 — n. ischiadicus, 2 — n. suralis, 3 — n. peroneus communis, 4 — n. tibialis, 5 — n. peroneus profundus, 6 — n. peroneus superficialis, 7 — m. sartorius, 8 — m. rectus femoris, 9 — m. vastus lateralis, 10 — m. adductor femoris, 11 — m. semimembranosus, 12 — m. semitendinosus, 13 — m. vastus intermedius, 14 — m. plantaris, 15 — m. gastrocnemius, 16 — m. peroneus longus, 17 — m. tibialis anterior, 18 — tendo Achilles, 19 — m. tensor fasciae latae, 20 — m. fascia lata, 21 — m. vastus medialis, 22 — m. iliopectineus, 23 — m. pectineus, 24 — m. adductor longus, 25 — m. popliteus, 26 — m. flexor longus digitorum

и горячий); нембутал; эфир; глюкоза 20%-ный раствор — 20 мл, кофеин 30%-ный раствор — 1 мл; пенициллин; стрептомицин и стрептоцид (порошок); анальгин; операционный стол, стол для инструментов; маска для наркоза; лямки — 4 шт.; медицинские весы; фотоаппарат.

Операцию проводят под эфирно-нембуталовым наркозом, а в случаях, когда введение нембутала нежелательно, перерезку спинного

мозга производят под глубоким эфирным наркозом. После трахеотомии кошку фиксируют на операционном столе спиной вверх. Вначале находят ориентиры, по которым определяют границы последнего грудного и первого поясничного позвонков. Th_{12} находят по месту прикрепления к нему последней пары ребер. Последний поясничный L_7 и первый крестцовый S_1 находят по сросшемуся с тазовыми костями первому крестцовому позвонку.

Высокую перерезку спинного мозга проводят на уровне Th_{12} и L_1 позвонков, что соответствует 2—3 поясничным сегментам. В области перерезки готовят операционное поле: выстригают шерсть и смазывают кожу настойкой йода. Скальпелем делают разрез кожи вдоль вершин остистых отростков позвонков. С целью обеспечения подхода к спинному мозгу длина кожного разреза должна превышать число подлежащих удалению дужек минимум на два позвонка (один выше, один ниже, в нашем случае $Th_{11} - L_2$). После этого необходимо очистить дужки позвонков от прикрепленных к ним мышц. Для этого скальпелем надсекают фасции и сухожилия паравертебральных мышц, прикрепляющихся с обеих сторон к вершинам остистых отростков. Не следует отсоединять скальпелем мышцы, перерезая их, во избежание кровотечения. Надрезав с одной стороны на вершинах остистых отростков надкостницу до кости, производят тупым способом отслойку мышц от тел позвонков, используя для этого распатор. Затампонировав щель между отслоенными мышцами и остистыми отростками, то же самое делают на другой стороне. Кровотечение останавливают, помещая в области между отростками и мышцами сухие или смоченные горячим раствором Рингера ватно-марлевые тампоны. Вскрывают спинной мозг. Для этого вначале костными кусачками убирают остистые отростки трех позвонков. Затем скусывают оставшиеся основания удаленных отростков, причем необходимо захватывать как можно больше костной ткани и с поверхности дужек. Истончив дужки и образовав в них щель, производят из нее выкусывание двух позвонков. Не следует очень широко раскрывать спинной мозг латерально, так как можно поранить крупные межпозвоночные вены, проходящие вдоль стенок межпозвоночных отверстий. Они не спадаются и дают сильное кровотечение. Для остановки костного кровотечения используют воск, а для остановки кровотечения из венозного сплетения позвоночного канала и межпозвоночных вен можно использовать тампоны, смоченные горячим раствором Рингера или перекисью водорода, а также кусочки выпрепарованных мышц. На данном этапе операции кошке следует ввести дополнительно нембутал или эфир для углубления наркоза.

После вскрытия позвоночного канала становится видна твердая мозговая оболочка. Иглой с шелковой нитью осторожно захватывают ее и прошивают, накладывая несколько лигатур с обеих сторон, но не завязывая их. Приподняв твердую мозговую оболочку за лигатуры над мозгом, разрезают ее по средней линии. С помощью лигатур разводят края твердой мозговой оболочки. Проверив глубину наркоза, приступают к перерезке спинного мозга. При поверхностном наркозе явления спинального шока в результате перерезки могут быть столь

сильными, что это может привести к гибели животного. Под спинной мозг подводят фидер и быстро делают перерезку глазным скальпелем или глазными ножницами, располагая их перпендикулярно поверхности спинного мозга. В случае полной перерезки фидер легко вынимается из раны. Перерезают спинной мозг на уровне первых поясничных сегментов. Как правило, в результате операции возникает небольшое кровотечение, которое надо остановить, наложив тампон, смоченный горячим раствором Рингера, в области разреза. После остановки кровотечения тампон убирают, твердую мозговую оболочку зашивают с помощью тех лигатур, которые использовали для ее растягивания. Кожу зашивают.

Если работу с животным предполагают в день перерезки, то операцию проводят обычно только с использованием эфира. После перерезки спинного мозга животное оставляют на 1,5—2 ч, чтобы прошли явления острого спинального шока (см. тему IV). В этот период нельзя оставлять животное без наблюдения: может произойти остановка дыхания. В этом случае необходимо срочно перевести животное на искусственное дыхание.

При работе с животным на следующий день можно применять эфирно-нембуталовый наркоз. После перерезки спинного мозга животное обкладывают грелками или включают подогрев на операционном столе. Вечером животному вводят внутривенно 20 мл 10%-ного раствора глюкозы, а при больших кровопотерях — физиологический раствор. На следующее утро снова внутривенно вводят 20 мл глюкозы и начинают препаровку мышц и нервов для продолжения эксперимента. До начала препаровки тщательно подготавливают к работе установку.

Установка включает в себя 2 стимулятора, миограф Крисса с двумя рычажками, двухполюсные ключи — 2, электромагнитные отметчики — 2, отметчик времени, кимограф с удлинителем, аккумулятор, погружные раздражающие электроды. Необходим набор хирургических инструментов, а также тампоны, салфетки, нитки суровые для крепления мышц, 2 груза. Операционный стол должен иметь подогрев, можно использовать водяные грелки.

Поскольку запись ведется на большой скорости вращения барабана кимографа, необходимо заранее подготовить 2—3 закопченные ленты для быстроты их замены без остановки эксперимента. Всю регистрирующую часть установки располагают на 2-м операционном столе, поставленном в продолжение 1-го, на котором размещено животное. Металлические части установки заземляют вместе со стимулятором и операционным столом. Миографы Крисса крепят на универсальные штативы и располагают между операционными столами, причем необходимо следить за тем, чтобы грузы, подвешенные на нитках к рычагам для записи сокращения мышц, не препятствовали записи.

Спинальное животное располагают на спине на малом операционном столе; под голову подкладывают подушку, передние лапы привязывают. На обеих задних конечностях выпрепаровывают четырехглавые мышцы — *m. quadriceps*, полусухожильные — *m. semitendinosus*, малоберцовые нервы — *n. peroneus* (рис. 79). К мышечным

сухожилиям привязывают суровые лигатуры, нервы берут на лигатуры из толстых шелковых ниток.

Ход работы. 1. Подвести электроды под малоберцовый нерв одной конечности.

2. К лигатурам, соединенным с рычагами писчиков, прикрепить полусухожильную и четырехглавую мышцы.

3. Придерживая обе лапы кошки, нанести раздражения и подобрать такую силу и частоту раздражения, при которых происходит сокращение полусухожильной и расслабление четырехглавой мышцы этой же конечности.

4. Подвести электроды под малоберцовые нервы обеих конечностей.

5. Нанести раздражение на малоберцовый нерв одной конечности, и на фоне изменения тонуса исследуемых мышц этой же конечности применять кратковременное раздражение малоберцового нерва второй конечности, не прекращая раздражения нерва первой лапы.

6. Проследить процессы последействия, возникающие при снятии контралатерального раздражения и при последующем прекращении ипсилатерального раздражения.

Задача 2. Контралатеральное торможение и антагонистические отношения для одноименных мышц задних конечностей

Методика. Все приемы препаровки, подготовку животного к эксперименту и установку см. в задаче 1.

Ход работы. 1. Подвести под малоберцовый нерв одной конечности электроды.

2. К лигатурам, соединенным с рычагами писчиков, прикрепить полусухожильные мышцы обеих конечностей.

3. Включить кимограф, нанести раздражение на малоберцовый нерв и записать изменение тонуса обеих мышц.

4. Подвести электроды под малоберцовые нервы обеих конечностей и последовательно подавать раздражение на нервы одной, затем другой конечности.

5. На фоне раздражения малоберцового нерва одной конечности включить на короткое время раздражение малоберцового нерва второй конечности.

Задача 3. Проявление ритмических рефлексов («шагательный рефлекс»), обеспечиваемых только собственно координационными механизмами спинного мозга

Методика. Задачу выполняют на кошке, у которой перерезка спинного мозга проведена за 1—2 недели до опыта (см. методику задачи 1 темы II). Выпрепаровывают малоберцовый нерв (см. рис. 79). Установка та же, что и в предыдущих задачах. Рычаги писчиков соединяют со стопами лап.

Ход работы. Включить кимограф и при длительном раздражении малоберцового нерва зарегистрировать серию движений, воспроизводящих антагонистические отношения мышц конечностей при шаговых движениях.

Обработка результатов. Объясняют роль силы и частоты раздражения афферентного нерва в проявлении ипси- и контралатеральных тормозных явлений. Формулируют правило реципрокности и рассматривают доказательства роли промежуточных нейронов в полисинаптических дугах сгибательных рефлексов.

Рекомендуемая литература: [15] — с. 234—259; [33] — с. 113—137; [45] — с. 70—78, 181—201; [66] — с. 171—217; [69] — с. 98—122.

ТЕМА III. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕФЛЕКТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СПИННОГО МОЗГА

Две задачи данной темы включают микро- и макроморфологическое изучение спинного мозга кошки. Две другие задачи посвящены электрофизиологическому исследованию рефлекторных ответов в передних корешках спинного мозга и в нерве, подходящем непосредственно к мышце. Микроэлектродное внутриклеточное исследование спинного мозга требует специальной аппаратуры и определенных навыков работы с микроэлектродом, и за время, отведенное на практические занятия, трудно выполнимо при самостоятельной работе студентов. Такое исследование может быть проведено дополнительно в качестве демонстрационного занятия. Выполнению электрофизиологической задачи обязательно должно предшествовать анатомо-гистологическое изучение спинного мозга.

Гистологический анализ нейронов спинного мозга позволяет выделить следующие скопления нервных клеток: медиальные и интермедиолатеральные ядра в промежуточной зоне серого вещества, кларков столб и собственное ядро в дорсальном роге. Общее число нейронов в спинном мозге человека равно приблизительно $1,35 \cdot 10^7$, у собаки и кошки $1 \cdot 10^7$. У кошки в вентральной части переднего рога мотонейроны составляют половину всех нейронов, а в целом — восьмую часть. Наиболее обширную группу клеток составляют нейроны, типичные для промежуточного вещества, откуда они в процессе онтогенеза распространяются в передние и задние рога. В этих отделах выделяются резко отличающиеся по строению двигательные клетки передних рогов, нейроны столба Кларка и желатинозной субстанции (рис. 80). Как показано на рисунке, нейроны, расположенные между сенсорными и моторными нейронами, называемые в стволе мозга ретикулярными, находятся в спинном мозге в образовании, которое продолжается без перерыва вдоль оси спинного мозга и которое по аналогии со стволом может быть обозначено как спинно-мозговая ретикулярная формация.

В нейрсофизиологии (В. Rexed, 1954) принято деление серого вещества спинного мозга на пластинки (рис. 81, А). Пластинки I—IV образуют «головку дорсального рога» и являются первичной сенсорной областью, проекцией большей части экстероцептивных афферентных волокон от туловища и конечностей (рис. 81, Б). К механорецепторам I идут волокна от крупных афферентных нейронов 2. В пределах заднего рога волокна этих клеток, входящие через задние корешки, ветвятся в пределах желатинозной субстанции 9, образуют синаптические контакты на крупной клетке T IV слоя. Тонкие свободные рецепторные нервные окончания в коже 3 принадлежат более мелким афферентным нейронам 4. В спинном мозге отростки этих клеток ветвятся в III слое и контактируют с клетками I слоя. Нейроны II слоя желатинозной субстанции 5 отдают аксоны в тракт Лиссуера. Клетки III слоя 6 дают аксоны, ветвящиеся в ростральном и каудальном направлениях по боковому тракту *fasciculus proprius lateralis* и возвращающиеся во II слой; нейроны желатинозной субстанции 7 посылают аксоны к дендритам крупных клеток T IV слоя 8 на противоположную половину спинного мозга. На нейронах IV слоя оканчивается боковая часть пирамидного тракта 10.

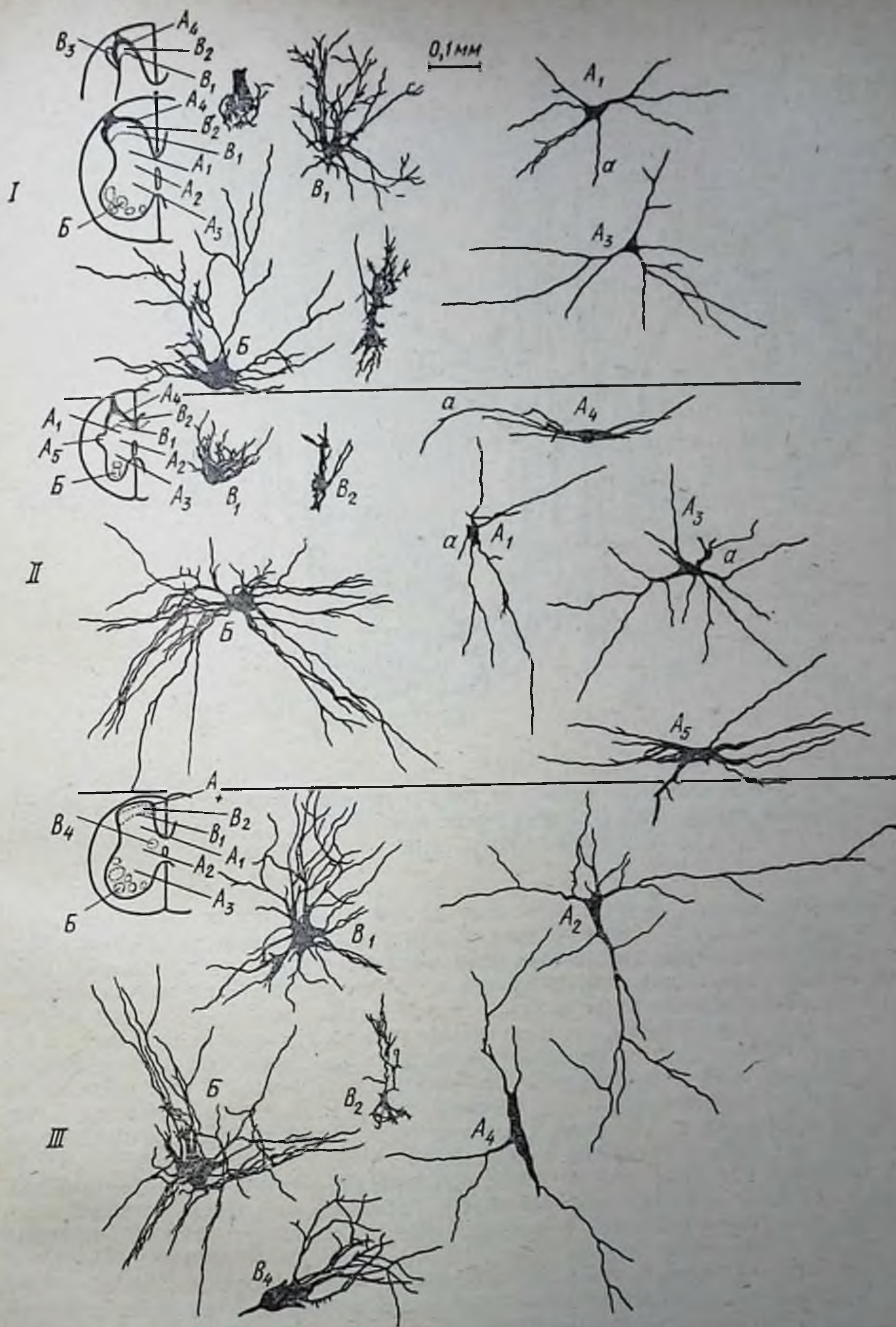


Рис. 80. Организация клеточного строения спинного мозга кошки (по Г. П. Жуковой. 1977):

I — шейный, II — грудной, III — поясничный отделы; А — ретикулярные нейроны, Б — мотонейроны, В — клетки чувствительных ядерных комплексов, а — аксон

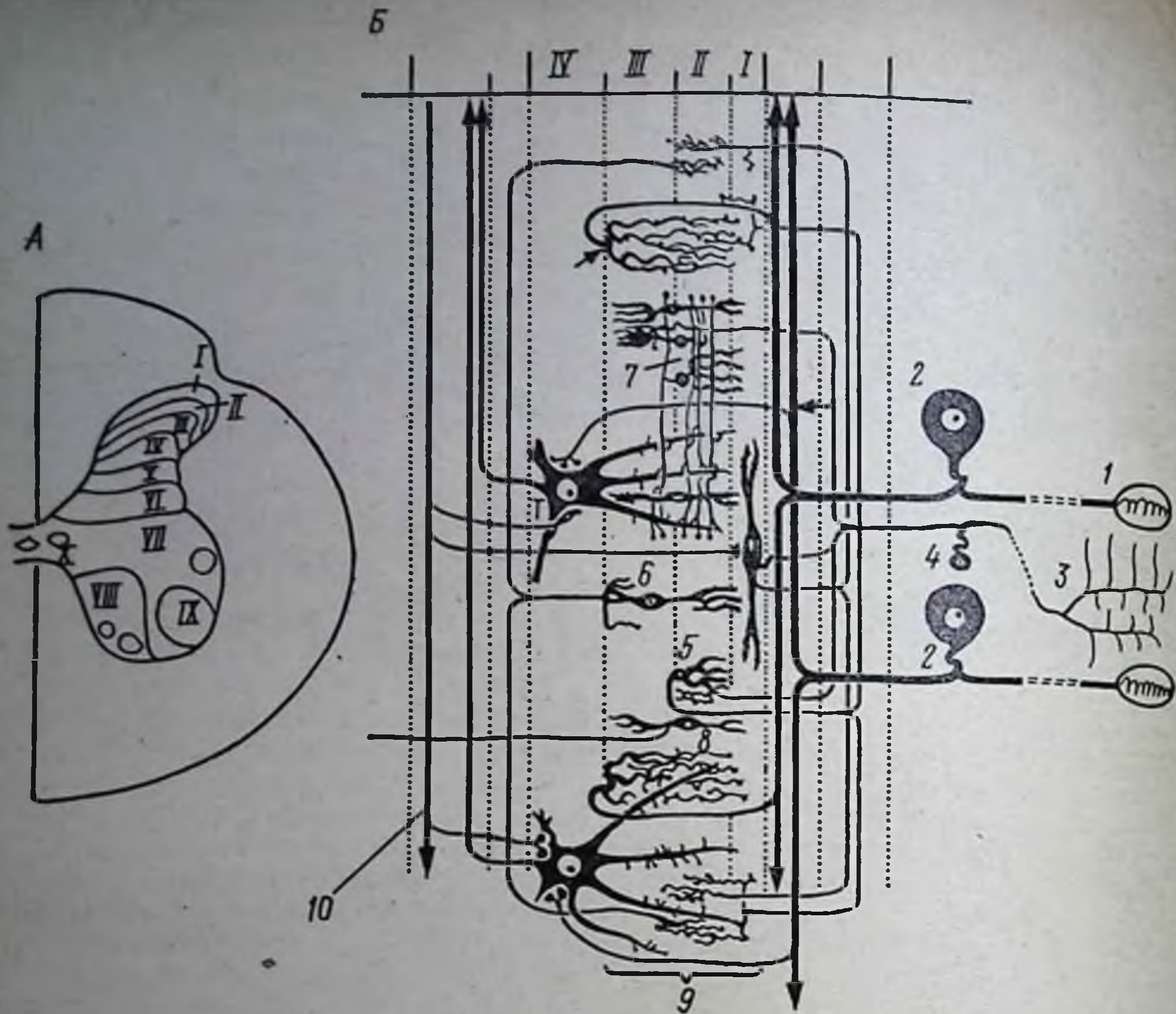


Рис. 81. Деление серого вещества на пластинки (А) (по В. Rexed, 1954) и клеточная организация задних рогов спинного мозга (Б) (по Я. Сентаготан, 1964). Объяснение см. в тексте

Взаимоотношения отростков клеток заднего рога важно знать для анатомического обоснования явлений пресинаптического торможения, выявленного и доказанного электрофизиологическими методами. Оно обеспечивается аксо-аксональными синапсами, образованными особой системой вставочных нейронов. Выявлены нейроны пирамидной формы на границе $III—IV$ слоев по Рекседу. Они отдают короткие аксоны, ветвящиеся в дорсальном направлении в желатинозную субстанцию, и образуют терминали на первичных афферентах.

Пластинки $V—VI$ образуют «шейку дорсального рога». В этой области заканчиваются волокна проприоцептивной чувствительности от туловища и конечностей и волокна от моторных областей коры. Здесь происходит интеграция рефлексов для точной регуляции движений.

Пластинка VII является областью обширных проприоспинальных и висцеральных связей и областью афферентных и эфферентных связей спинного мозга с мозжечком и средним мозгом. Уходящая в вентральный рог часть VII пластинки содержит тормозные клетки Реншоу. Пластинка $VIII$ содержит нейроны, способные модулировать моторную активность и характеризующиеся бульбоспинальными и проприоспинальными (особенно контралатеральными и комиссуральными) связями. Пластинка IX состоит из мотонейронов спинного мозга, объединенных в функциональные группы, и является первичной моторной областью серого вещества спинного мозга. Это *общий конечный путь* рефлексов спинного мозга. Мотонейроны спинного мозга млекопитающих разделяются на *альфа- и гамма-мотонейроны*; аксоны первых иннервируют поперечнополосатые мышечные волокна, вторых — интрафузальные волокна проприорецепторов. Они отличаются между собой по течению следовых процессов, длительности

ПД и другим параметрам. Промежуточные нейроны спинного мозга отличаются от мотонейронов по электрофизиологическим характеристикам. Длительность ПД промежуточного нейрона не превышает 1 мс, спайк не сопровождается заметной следовой гиперполяризацией, что определяет их способность разряжаться продолжительным ритмическим залпом.

Для исследования активности рефлекторных дуг чаще всего применяют так называемый «препарат Ллойда». У кошки обнажают спинной мозг поясничного

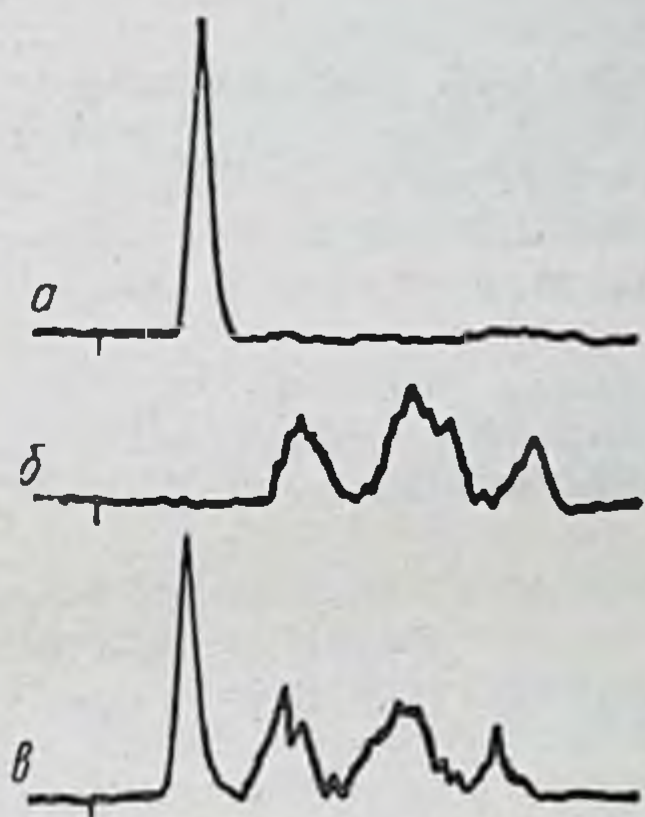


Рис. 82. Потенциалы переднего корешка, вызванные стимуляцией разных афферентных нервов (по D. Lloyd, 1943):

а — начальный спайк двухнейронной дуги, вызванный стимуляцией мышечного нерва, *б* — потенциалы, вызванные стимуляцией кожного сенсорного нерва и проходящие с задержкой по полисинаптическим путям, *в* — моно- и полисинаптические ответы при стимуляции заднего корешка

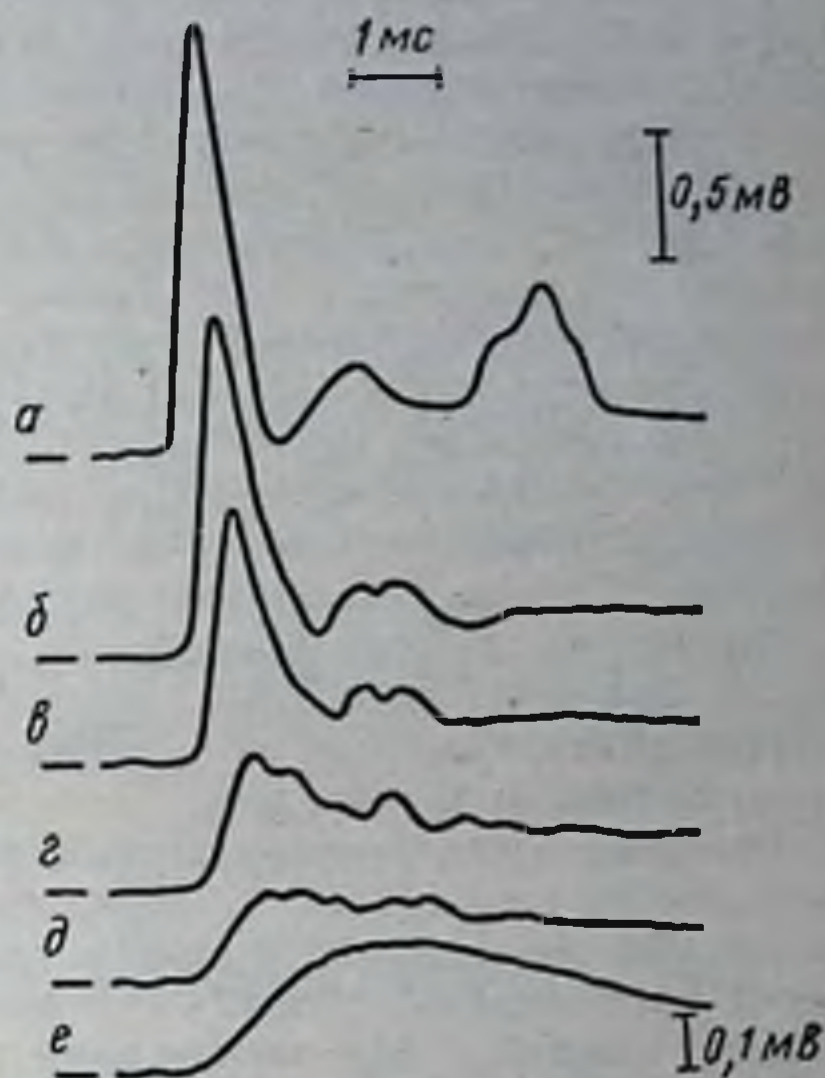


Рис. 83. Потенциалы переднего корешка, вызванные стимуляцией заднего корешка того же сегмента у кошки (по J. Eccles, 1946):

а — разряды неправильной формы (за начальным спайком двухнейронной дуги), приходящие по полисинаптическим путям, до наркоза; *б—д* — действие постепенно углубляющегося барбитуратного наркоза, выявляющее синаптический потенциал

и крестцового отделов и пересекают передние и задние корешки. Для предотвращения подсыхания спинной мозг заливают вазелиновым маслом. Под задние корешки подводят раздражающие электроды, под передние — регистрирующие. При кратком электрическом раздражении центрального конца дорсального корешка в переднем корешке регистрируется типичная картина последовательных разрядов. Первый рефлекторный ответ возникает с латентным периодом около 1,5 мс и имеет форму монофазной волны продолжительностью несколько миллисекунд. Этот ответ называется *моносинаптическим*. Затем следует разряд, состоящий из неправильных волн, длящийся 10—15 мс. Это *полисинаптический* ответ (рис. 82). Моносинаптический рефлекс — это сложный ответ моторных компонентов двухнейронной дуги и следующие за ним потенциалы являются ответами тех же мотонейронов, но на сигналы, приходящие позднее через вставочные нейроны. От спайка они отделены интервалом времени, которое уходит на задержку в промежуточных синапсах. Физиологическим эквивалентом такого искусственно вызванного моносинаптического рефлекса является миотатический рефлекс или рефлекс на растяжение, например коленный.

В составе задних корешков в спинной мозг входят афферентные волокна различных типов. Для отдельного их вовлечения следует раздражать не задние корешки, а различные кожные и мышечные нервы. От кожи идут волокна с более

высоким порогом, чем от мышечных веретен. Импульсный разряд двухнейронной дуги преимущественно ограничен мотонейронами той самой мышцы, веретена которой были растянуты. В то же время полисинаптические ответы регистрируются в нервах, иннервирующих соседние мышцы, участвующие в общем движении. Так, стимуляция большеберцового нерва, иннервирующего заднюю большеберцовую мышцу, вызывает полисинаптический разряд в малоберцовом нерве, иннервирующем переднюю большеберцовую мышцу, но моносинаптический ответ никогда не регистрируется в малоберцовом нерве в таких условиях опыта. Таким образом, раздражение мышечных нервов дает возможность понять взаимодействие нервов, иннервирующих мышцы-синергисты и антагонисты при рефлекторной передаче. При раздражении кожных нервов возникает ответ переднего корешка, состоящий только из полисинаптических разрядов, которым не предшествует моносинаптический ответ. Одновременно моносинаптический и полисинаптический ответы можно зарегистрировать в переднем корешке при раздражении смешанного нерва, например малоберцового. Если на фоне раздражения смешанного нерва или заднего корешка ввести животному раствор нембутала, который резко подавляет активность промежуточных нейронов, то наблюдается сначала исчезновение полисинаптического ответа, затем уменьшение амплитуды, исчезновение моносинаптического ответа и в конце сохраняется только синаптический потенциал (рис. 83).

Большая продолжительность полисинаптических разрядов определяется длиной афферентного пути, разной скоростью распространения возбуждения по афферентным волокнам, имеющим разный диаметр, активностью промежуточных нейронов и их числом.

Реакция пула участвующих в рефлексе мотонейронов определяется числом возбужденных афферентов. Моносинаптический рефлекс позволяет исследовать зависимость возбудимости нейронов от влияния синаптической активности: измеряют амплитуду моносинаптического ответа по мере усиления вызывающего его раздражения. При увеличении силы раздражения амплитуда моносинаптического ответа растет и зависимость между этими величинами описывается S-образной кривой.

При внутриклеточном микроэлектродном отведении от мотонейронов их активность можно регистрировать при ортодромном раздражении (раздражение заднего корешка) или антидромном (раздражение переднего корешка). Ответ на антидромное раздражение появляется с коротким латентным периодом, который определяется временем распространения ПД по аксону того мотонейрона, от тела которого регистрируют активность. После разряда мотонейрона отмечается характерная следовая гиперполяризация. Малый латентный период и следовая гиперполяризация отличают ответ мотонейрона от активности вставочного нейрона, которому свойствен большой латентный период и отсутствие следовых процессов.

Ортодромный ответ мотонейрона отличается значительным латентным периодом, определяющимся истинной синаптической задержкой. При уменьшении силы ортодромного раздражения можно зарегистрировать не спайк мотонейрона, а процесс с меньшей амплитудой и большей длительностью. Этот потенциал, возникающий в постсинаптической мембране, представляет собой локальную нераспространяющуюся, медленно нарастающую градуальную реакцию, которая не имеет рефрактерного периода и поэтому может суммироваться с последующей реакцией, если она возникает до окончания первой. Таким образом, в возбуждательном синапсе возникает ВПСП, представляющий собой деполяризацию мембраны, которая, достигнув порога, вызовет в клетке разряд, и по аксону мотонейрона распространится ПД. Благодаря разрядам спинальных вставочных нейронов происходит постоянная подпороговая синаптическая «бомбардировка» мотонейронов. Уровень фоновой синаптической активности определяет возбудимость мотонейронов. При увеличении фоновой синаптической активности для вызова распространяющегося импульса в мотонейроне достаточно слабого афферентного раздражения. С фоновой вариацией возбудимости мотонейрона связан и разный латентный период, с которым появляется ПД по отношению к афферентному залпу, вызывающему ВПСП.

Если в синапсе выделяется тормозной медиатор, возникает гиперполяризация постсинаптической мембраны, т. е. ТПСП, препятствующий разряду клет-

ки. Тормозными медиаторами в настоящее время считают глицин и гамма-аминомасляную кислоту.

Существуют четко ограниченные системы афферентных путей спинного мозга, связанные с различными внутрицентральными механизмами и вызывающие свои рефлекторные реакции. Все эти афферентные пути имеют общее свойство: их возбуждение приводит к развитию длительной деполяризации центральных разветвлений. Длительность электрических потенциалов, отражающих деполяризацию афферентных терминалей, достигает 200—400 мс, а амплитуда их колеблется в пределах 500 мкВ — 1 мВ. Деполяризация создается в афферентных окончаниях аксонами особых промежуточных нейронов, которые возбуждаются афферентным залпом, поступающим в спинной мозг по волокнам Iа. Функциональное значение первичной афферентной деполяризации терминалей заключается в ограничении поступающей в спинной мозг информации в пользу сильных и, следовательно, биологически более важных афферентных сигналов.

Цель работы. Изучить микроморфологию спинного мозга кошки (по гистологическим препаратам). Изучить макроанатомию и топографию спинного мозга и проследить эффекты, возникающие при раздражении корешков спинного мозга (закон метамерии). Зарегистрировать «Н»-рефлекс головки икроножной мышцы у кошки. Зарегистрировать моносинаптический и полисинаптический ответы в передних корешках спинного мозга при раздражении икроножного и малоберцового нервов.

З а д а ч а 1. Микроморфология спинного мозга кошки

Методика. Для работы необходимы микроскоп МБ-9, бинокулярная лупа, окуляр-микрометр, объект-микрометр, рисовальный аппарат. Просматривают гистологические препараты поперечных срезов спинного мозга кошки.

Ход работы. 1. Рассмотреть при малом увеличении микроскопа препарат спинального ганглия, обращая внимание на общую структуру ганглия.

2. Исследовать при большом увеличении микроскопа особенности строения афферентного нейрона, уделив особое внимание параллельному ходу двух отростков вблизи сомы нейрона. Проследить взаимоотношение центробежного и центростремительного отростков.

3. Зарисовать схематически афферентный нейрон.

4. Просмотреть и сравнить под бинокулярной лупой и при малом увеличении микроскопа поперечные срезы шейного, грудного, поясничного и крестцового отделов спинного мозга.

5. Нарисовать и сравнить соотношение площадей серого и белого вещества на поперечных срезах различных отделов спинного мозга.

6. Нанести на крупном по масштабу рисунке среза спинного мозга расположение нейронов в соответствии с пластинками серого вещества по Б. Рекседу (см. рис. 81, А).

7. При рассмотрении поясничного отдела подробно изучить нервные клетки передних и боковых рогов серого вещества, желатинозной субстанции и ядра заднего рога. Сосчитать число клеток в разных областях серого вещества. Сопоставить нарисованные клетки с типами клеток, приведенных на рис. 80.

Обработка результатов. В отчет представляют рисунки, цифровые показатели, распределение различных нейронов в сером веществе спинного мозга. На один из рисунков наносят схему Б. Рекседа. В подписях к рисункам указывают, почему те или иные клетки отнесены к мотонейронам или промежуточным нейронам.

Задача 2. Изучение анатомии спинного мозга кошки и эффектов раздражения корешков спинного мозга

Методика. Операцию вскрытия спинного мозга проводят по правилам, изложенным в задаче 1 темы II, но вскрывают не определенный сегмент, а поверхность мозга на всем протяжении от TR_{12} до S_1 . Для раздражения используют стимулятор типа ЭСЛ-2. В качестве раздражающих электродов применяют серебряные проволоочки. Животное обогревают с помощью грелки. Спинной мозг увлажняют теплым раствором Рингера.

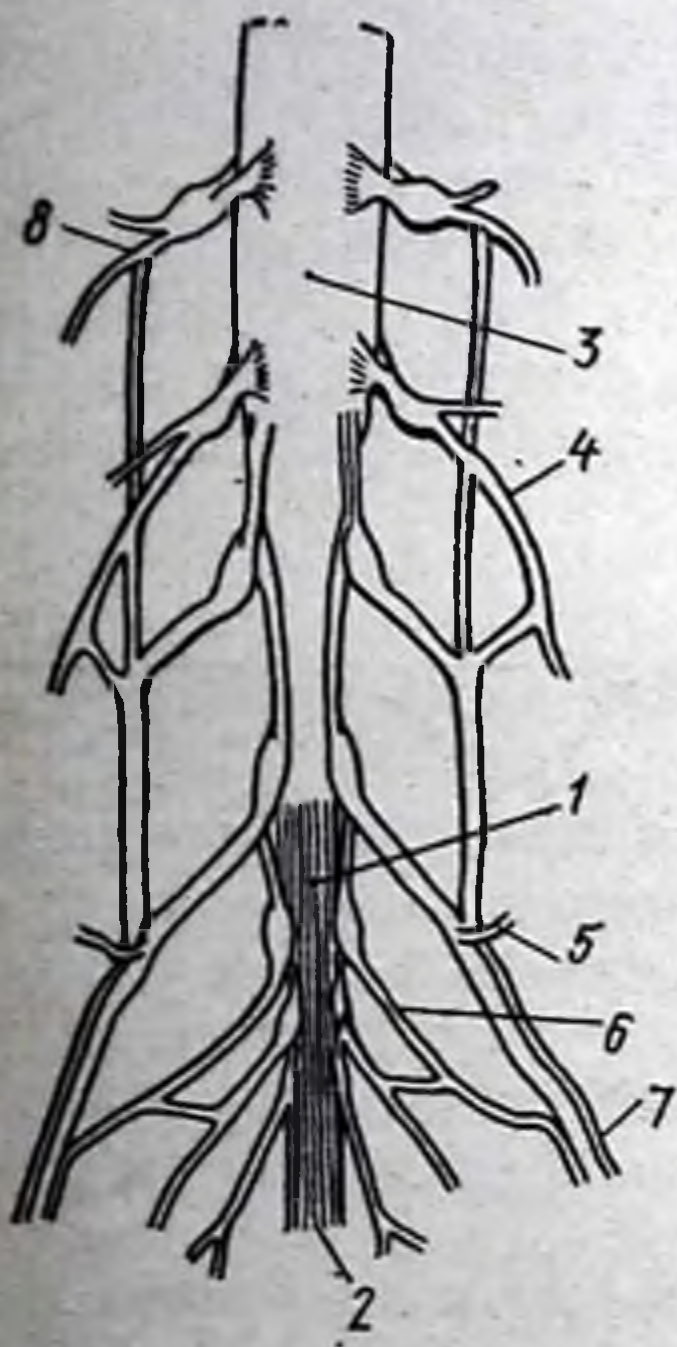


Рис. 84. Спинной мозг кошки с дорсальной стороны (по А. Д. Ноздрачеву, 1973):

1 — cauda equina, 2 — filum terminale, 3 — intumescencia lumbalis, 4 — pl. lumbalis, 5 — pl. lumbosacralis, 6 — pl. sacralis, 7 — n. ischiadicus, 8 — n. spinalis

Ход работы. 1. Вскрыть твердую мозговую оболочку и, взяв ее с обеих сторон на лигатуры, обнажить спинной мозг (рис. 84).

2. Стараясь не повредить спинной мозг, с помощью стеклянных крючков найти задние и передние корешки. Сопоставить уровни выхода корешков из спинного мозга и из спинно-мозгового канала.

3. Отсепаровать передние корешки, подвести под них электроды, подать раздражающий стимул и пронаблюдать сокращение соответствующих групп мышц.

Обработка результатов. Во время работы делают рисунки или фотографии последовательных этапов операции, топографию корешков. Составляют таблицу, в которой указывают, какому позвонку соответствует выход корешков и от какого сегмента спинного мозга. Описывают результаты раздражения корешков.

Задача 3. Регистрация «М» - и «Н» -ответов в икроножной мышце кошки при раздражении большеберцового нерва

Методика. Препаровку и опыт ведут с использованием эфирного наркоза. Кожный разрез делают над икроножной мышцей и в подколенной ямке. Выпрепаровывают большеберцовый нерв n. tibialis на участке выше ответвления от него веточек к головкам икроножной

мышцы (рис. 85). Икроножную мышцу прошивают двумя икилиновыми проводочками, изоляция которых зачищена на участке длиной 4—5 мм. Они обеспечивают контакт с мышечными единицами. Одни концы заранее завязывают узелком для закрепления электродов в

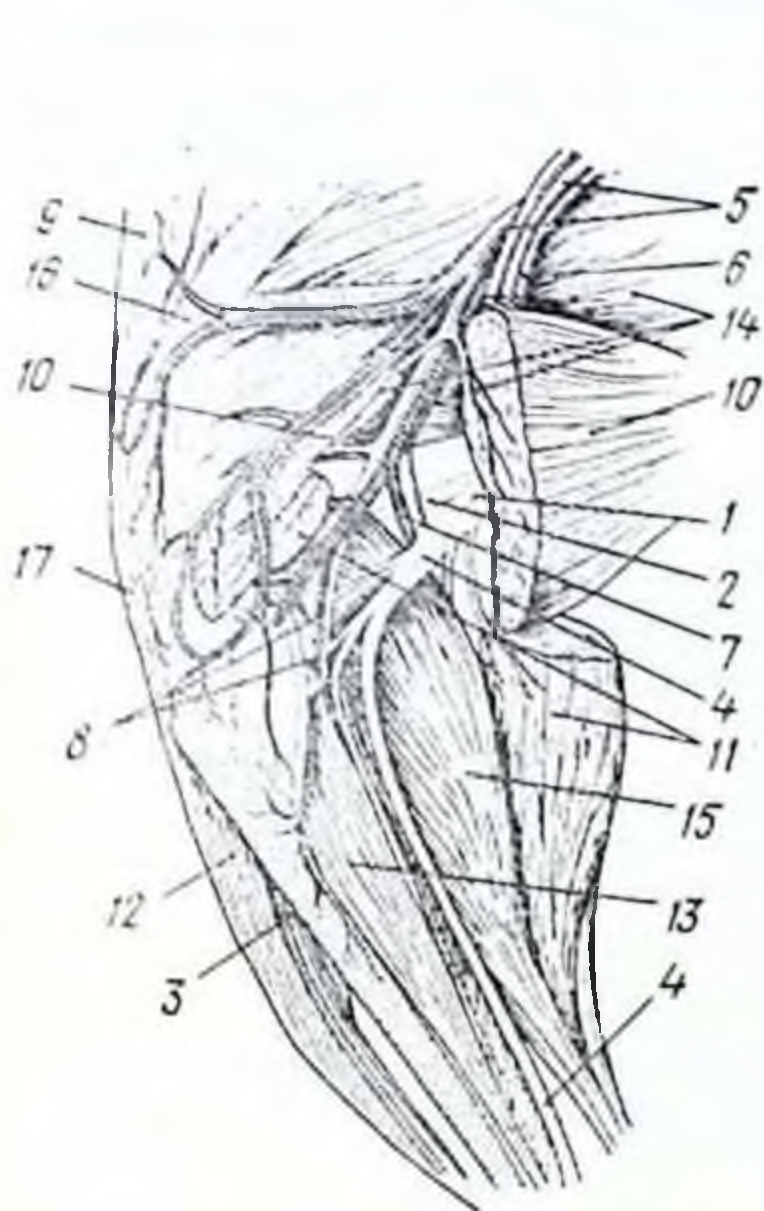


Рис. 85. Нервы и сосуды медиальной подколенной области кошки (по А. Д. Ноздрачеву, 1973):

1 — n. ischiadicus, 2 — n. peroneus communis, 3 — n. peroneus profundus, 4 — n. tibialis, 5 — a. v. femoralis, 6 — a. n. saphenus, v. saphenus magna, 7 — a. v. suralis, 8 — a. v. tibialis posterior, 9 — m. sartorius, 10 — m. semimembranosus, 11 — m. gastrocnemius, 12 — m. tibialis anterior, 13 — m. flexor digitorum longus, 14 — m. adductor femoris, 15 — m. plantaris, 16 — fascia lata, 17 — lig. patellae

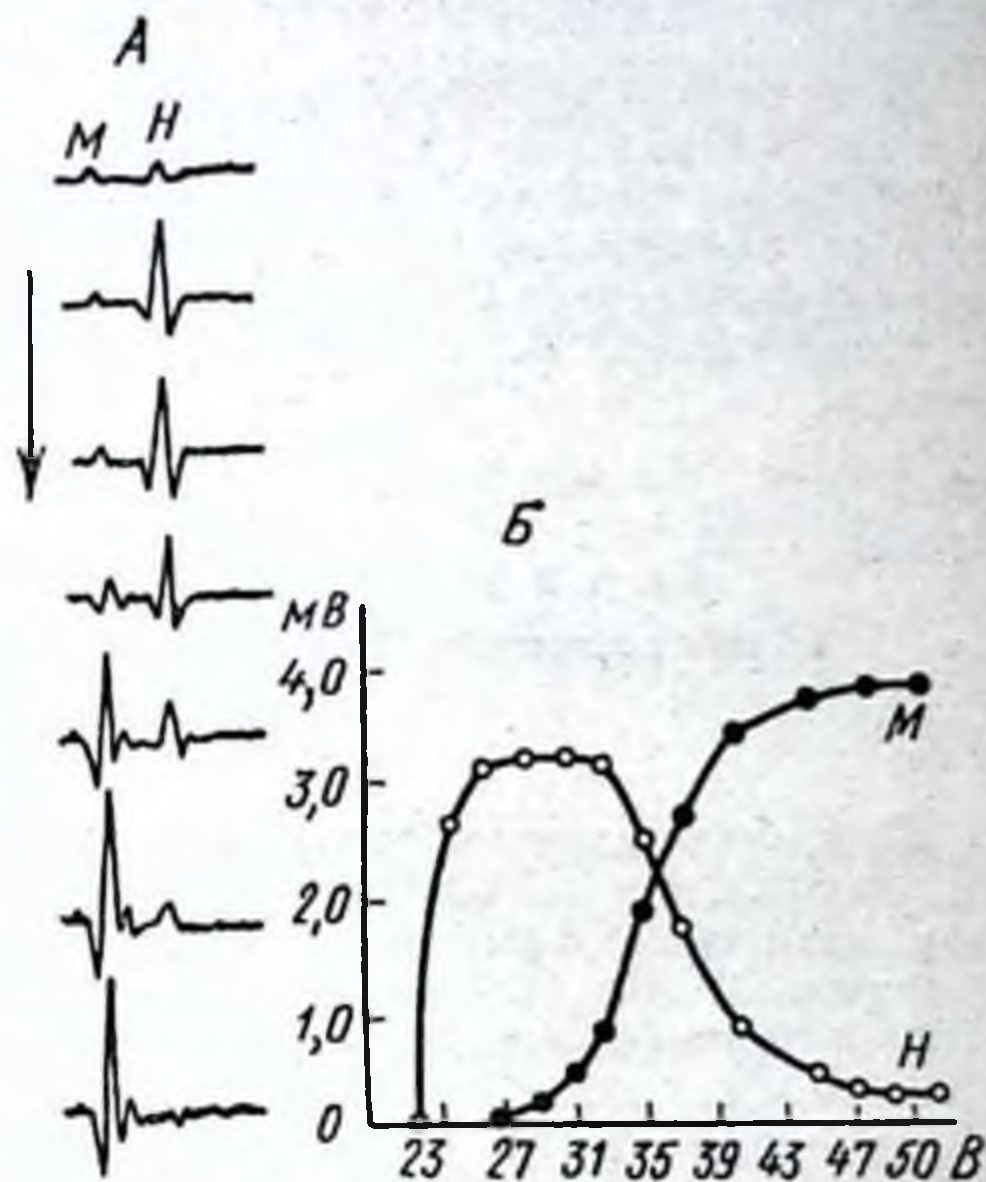


Рис. 86. H- и M-ответы камбаловидной мышцы при раздражении большеберцового нерва у человека. А — осциллограммы, Б — график изменений амплитуды ответов при увеличении силы раздражения (показано стрелкой) (по Я. М. Коцу, 1975)

мышце, вторые — соединяют с УБП. Для раздражения применяют погружные электроды.

Используют стимулятор типа ЭСЛ-2, УБП2-03 и лучевой осциллограф С1-18.

Ход работы. 1. Произвести синхронизацию запуска развертки луча осциллографа сигналом от стимулятора.

2. При частоте стимулов 1 имп/с производить раздражение большеберцового нерва, постепенно увеличивая силу раздражающего тока. Определять пороги появления «М»-ответа и рефлекторного «Н»-ответа и их зависимость от силы раздражающего тока.

Обработка результатов. При анализе полученных данных рассматривают: какие закономерности возбуждения различных афферентов в рефлекторной дуге определяют характер «Н»-рефлекса и какие осо-

бенности возбуждения афферентных моторных волокон определяют характер «М»-ответа. Прослеживают, как меняется «Н»-рефлекс не только от силы раздражающего тока, но и от положения регистрирующих электродов, опираясь на известные закономерности, полученные при регистрации «Н»-рефлекса у человека (рис. 86).

При слабом электрическом раздражении большеберцового нерва у человека (в подколенной ямке) в икроножной мышце регистрируется синхронизированный ПД с латентным периодом 25—30 мс. С увеличением силы появляется второй ответ с латентностью 5 мс. Ранний ответ вызван возбуждением двигательных волокон смешанного нерва, а более поздний — рефлекторный ответ мотонейронов на электрическое раздражение афферентного нерва.

Задача 4. Изучение электрофизиологических характеристик моносинаптической и полисинаптической рефлекторных дуг

Для работы необходимы: экранированная камера, куда помещают животное, расположенное на малом операционном столе; стимулятор ЭСЛ-2 с изолирующим трансформатором; осциллограф С1-16 или С1-18; УБП2-03, звуковой генератор ЗГ-2А; фотоаппарат «Зенит»-5М или фоторегистрирующее устройство ФОР; 2 пары погружных раздражающих электродов и 2 пары серебряных отводящих электродов. К препаровке корешков спинного мозга приступают только после приведения установки в рабочее состояние.

Методика. Делают высокую перерезку спинного мозга кошки, как в задаче 1 темы II, за 1—2 дня до опыта. В день эксперимента вскрывают спинной мозг на уровне поясничного отдела. Оставляют не вскрытой твердую мозговую оболочку и препаруют нервы, раздражение которых будет проводиться в дальнейшем. Выстригают шерсть на наружной поверхности голени и нижней части бедра одной из задних лап и делают продольный разрез кожи вдоль лапы на 5—6 см. На уровне колена делают неглубокий поперечный разрез в дистальной части латеральной головки четырехглавой мышцы бедра *m. vastus lateralis*, под которой располагается ствол малоберцового нерва *n. peroneus communis*. Нерв отсепааровывают на небольшой длине и берут на лигатуру. Для нахождения икроножного нерва *n. gastrocnemius* ствол малоберцового нерва отпрепаровывают вверх до места ответвления от него большеберцового нерва *n. tibialis*. От последнего, ниже его ответвления от малоберцового нерва, отходит икроножный нерв, уходящий в глубь икроножной мышцы; икроножный нерв также берут на лигатуру.

Для нахождения подкожного нерва голени *n. saphenus* делают кожный разрез с внутренней стороны лапы в верхней части бедра и между портняжной и приводящей мышцами отпрепаровывают подкожный нерв голени, который отходит от бедренного нерва *n. femoralis* и идет вместе с бедренными артерией и веной. Нерв берут на лигатуру. До начала раздражения нервов в рану закладывают ватный тампон, смоченный теплым раствором Рингера, края раны стягивают пинцетом Пезана.

Стеклянным крючком отпрепаровывают передние и задние корешки сегментов $L_6—L_7$ на той стороне, где отпрепарованы нервы задней конечности. На передние корешки надевают лигатуру и перерезают их дистально. Соседние, задние и передние корешки обрезают у самого спинного мозга. До начала опыта область мозга с отпрепарованными корешками закрывают ватным тампоном, смоченным теплым раствором Рингера.

Позвоночный столб кошки фиксируют в области крестца и верхней части поясничного отдела с помощью специальных зажимов, и столик с животным переносят в экранированную камеру. Животное, операционный стол и камеру заземляют.

Ход работы. 1. Подвести раздражающие электроды под икроножный нерв. На один канал усилителя осциллографа подать от звукового генератора калибровочный сигнал с частотой 1000 Гц.

2. Установить на стимуляторе частоту раздражающих стимулов 1 имп/с, длительность 0,5 мс, амплитуду от 1 до 20—30 В (запуск внутренний, синхронизированный).

3. Увеличивая силу раздражающего стимула, определить порог, а затем градацию моносинаптического ответа при стимуляции икроножного нерва.

4. Подвести раздражающие электроды под малоберцовый нерв и, увеличивая силу раздражения, зарегистрировать моно- и полисинаптический разряды и их градацию при изменении амплитуды раздражающего стимула.

5. Поместить серебряные электроды (раздражающие) на задние корешки и зарегистрировать одновременно моно- и полисинаптический разряды в передних корешках при стимуляции задних (одного из $L_6—L_7$).

6. Поместить раздражающие электроды на подкожный нерв, и при его раздражении зарегистрировать ответ в переднем корешке.

7. Полученные ответы регистрируют с экрана осциллографа.

Обработка результатов. Полученные поли- и моносинаптические ответы при раздражении различных нервов анализируют и описывают. Измеряют амплитуду и длительность разрядов, определяют латентные периоды разрядов. Строят графики зависимости амплитуды ответа от силы раздражающих стимулов. Объясняют, почему при раздражении одних нервов регистрируется полисинаптический, а при раздражении других — моносинаптический ответы. Рисуют схемы рефлекторных дуг этих рефлексов.

Рекомендуемая литература: [5] — т. 2, с. 22—25, 227—234; [12] — с. 89—106, 108—126; [13] — с. 278—281; [25]; [33] — с. 104—125; [34] — с. 30—61; [45] — с. 48—55, 70—78, 194—201.

ТЕМА IV. СПИНАЛЬНОЕ ЖИВОТНОЕ

Перерезка спинного мозга, т. е. отделение его от вышележащих отделов мозга, приводит к спинальному шоку. У высших позвоночных явления спинального шока, выражающиеся в сильном угнетении спинальных рефлексов, стойкие

и продолжительные. Сгибательные рефлексы восстанавливаются через несколько часов, вегетативные — не нормализуются в течение нескольких дней. Ведущая роль в возникновении спинального шока принадлежит не столько раздражающему действию самой перерезки, сколько устранению нисходящей активности, в результате чего снижается возбудимость нейронов спинного мозга, повышается их порог к афферентации, поступающей по задним корешкам в отсеченные сегменты спинного мозга. Это доказывается также прямым измерением мембранного потенциала мотонейронов спинного мозга; после холодового блока всех нисходящих путей спинного мозга наблюдается гиперполяризационный потенциал спинного мозга. Это и может служить объяснением торможения рефлексов, возникающего при хордотомии.

Перерезка значительно изменяет поток афферентных сигналов, поступающих к мотонейронам по внутрисегментарным рефлекторным дугам. Все это относится к результатам перерезки пирамидных, бульбоспинальных, нисходящих ретикулоспинальных путей. Перерезка путей, влияющих на возбудимость гамма-мотонейронов, приводит к изменению состояния мышечных веретен, что изменяет поток афферентных разрядов при растяжении той же мышцы или ее антагониста. При острой и хронической перерезках спинного мозга исчезает спонтанная активность гамма-мотонейронов разгибателей и становится невозможной активация этих нейронов при стимуляции афферентных нервов, что свидетельствует о фактическом выключении гамма-петли разгибателей.

Исследование спинного мозга ниже изолированного сегмента в условиях хронической перерезки в сроки до 13 месяцев после операции показало, что рефлексы этого отдела мало отличаются от рефлекторных дуг изолированного сегмента с изменениями в основном для разгибательных рефлексов: нарушение моносинаптической активации мотонейронов, появление низкоамплитудных асинхронных полисинаптических разрядов в ответ на раздражение волокон группы Ia, расширение зоны возбуждающих влияний мышечных афферентов. Рефлексы с кожных афферентов сохраняются, что позволяет проводить изучение рецептивных полей. При длительном выживании спинального животного меняются степень вызывания рефлексов, площадь рефлексогенных зон, пороги для вызова реакций. Так, шагательный рефлекс легко возникает в первые десять недель после операции, позднее — с трудом, а рецептивное поле его уменьшается.

Строгое соблюдение всех правил хордотомии и заботливое отношение к выхаживаемому животному позволяет сравнить рефлекторные ответы у хронических и остро оперированных животных.

Цель работы. Изучить операцию хордотомии (перерезка спинного мозга). Изучить явления спинального шока. Провести выхаживание животного в послеоперационном периоде, наблюдая вегетативные и двигательные расстройства. Изучить рефлексы задних конечностей в хроническом эксперименте в разные сроки после хордотомии.

З а д а ч а. Изучение влияния хордотомии на рефлекторную функцию спинного мозга

Для проведения задачи следует выбирать здоровых животных, так как летальность во многом определяется состоянием животного до операции.

Методика. Подготовку животного и высокую перерезку спинного мозга проводят по правилам, изложенным в задаче I темы II. После вскрытия твердой мозговой оболочки орошают операционное поле — спинной мозг и корешки — в течение 1—2 мин 2%-ным раствором новокаина. Важно избегать кровотечений на всех этапах операции с тем, чтобы хорошо видеть область операции.

В послеоперационный период ежедневно животным вводят антибиотики: пенициллин (2000—10 000 ед.) и стрептомицин (30—50 тыс. ед./кг). Кошку помещают в гамак и обогревают водяными грелками, переворачивая несколько раз в день с одного бока на другой для предотвращения пневмонии. Первые двое суток вводят физиологический раствор (20—40 мл) и глюкозу. Со вторых суток начинают кормление,

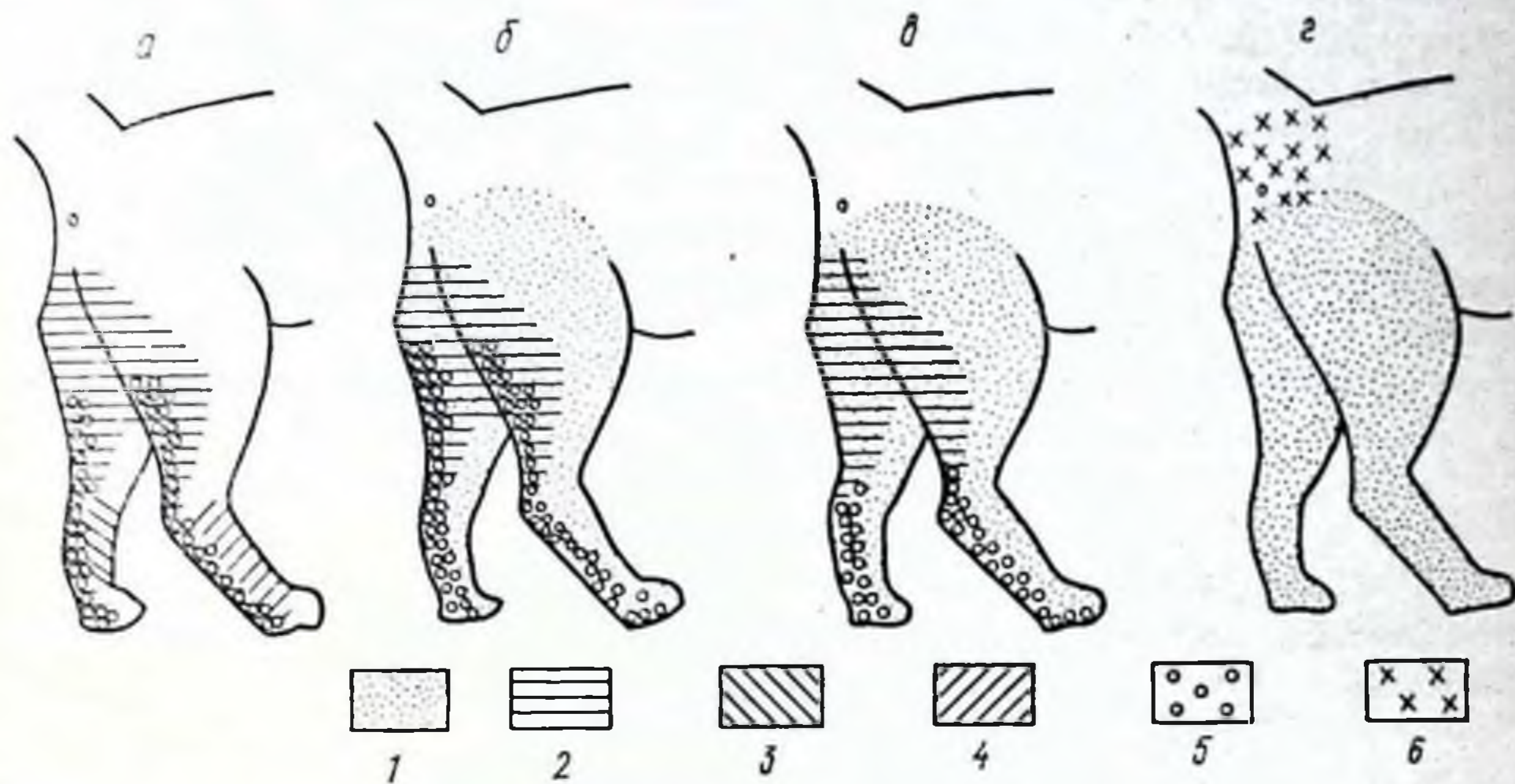


Рис. 87. Рефлекторные поля спинальных рефлексов у кошки по отношению к различным видам стимуляции (по L. Afelt, 1970):

а — чисто тактильное раздражение (сгибание нескольких волосков и поглаживание без прикосновения к коже). б — слабое прикосновение (давление, воздушная струя), в — смешанное раздражение (слабое пощипывание), г — болевое раздражение и охлаждение (сильные щипки, прикрепление зажимов, охлаждение хлористым этилом); 1 — флексия (общая флексия или сокращение отдельных флексоров). 2 — экстензия (общая экстензия или сокращение отдельных экстензоров). 3, 4 — вращение стопы с отведением и приведением пятки, 5 — всеобразное раздвигание пальцев, 6 — шагательный рефлекс

тогда как воду дают все время, начиная сразу после операции. Рекомендуется введение в рацион животного кислого молока. В связи с нарушением рефлекторного мочеиспускания в течение первых трех дней опорожняют мочевой пузырь кошки, надавливая на брюшную стенку. Для предотвращения возникающих болевых рефлексов за 15 мин до этого вводят анальгин (0,005 мг/кг).

Ход работы. 1. Сфотографировать характерную позу животного, положение задних конечностей при отсутствии опоры. Начинать наблюдения рефлекторных реакций спустя неделю после операции, используя следующие раздражения: *тактильные* — поглаживание гладкой кисточной шерсти без прикосновения к коже; последовательные поглаживания против шерсти; слабое прикосновение волосками Фрея, струей воздуха или слабым сжатием кожи рукой; *давление* — надавливание кончиком тупой иглы; слабое давление на центральную подушечку лапы; *болевое раздражение* — булавочные уколы; *комплексные раздражения* — надавливание на подушечку лапы или пальцев; охлаждение кожи струей хлористого этила; надавливание на мышцу тупым предметом (рис. 87).

Провести наблюдения: *инсилатеральных рефлексов* при раздражении кожи над мышцами (давление, болевое раздражение); описать сгибательный и разгибательный рефлексы, вызванные раздражением кожи; проследить за характером последующих генерализованных движений; *рефлекса веерообразного раздвигания пальцев* при поглаживании вентральной поверхности стопы и слабым пощипывании между пальцами, при повторном поглаживании подошвенной поверхности плюсны против шерсти (дорсальная флексия пальцев); *подошвенного сгибания пальцев* при локальном давлении тупой иглой на центральную подушечку лапы (плантарная флексия без движения когтей); *хватательного рефлекса* при сильном давлении на всю поверхность стопы между центральной подушечкой и подушечками пальцев; *миотатических рефлексов* — коленного и ахиллова при постукивании по мышцам.

3. Проследить, как влияет положение раздражаемой конечности на вызывание всех этих рефлексов.

4. Получить перекрестный разгибательный и шагательный рефлексы, раздражая зоны, указанные на рис. 87.

Обработка результатов. Представляют протокол операции и послеоперационного периода; фотографии животного после операции; описание рефлексов с указанием на схеме раздражаемых зон; результаты морфологического контроля спинного мозга.

Рекомендуемая литература: [33] — с. 113—143; [69]; [26].

ТЕМА V. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КОШКИ

Несмотря на обширные внутрикорковые связи удастся достаточно точно локализовать моторные области в коре больших полушарий у человека и животных, используя для этого тонкую градацию электрического раздражения. Электрофизиологические методы регистрации первичных и вторичных вызванных ответов в коре на антидромное и прямое раздражения существенно дополняют наши знания о локализации эффекторной функции коры больших полушарий.

Моторное поле коры — это область гигантопирамидных клеток. Оно занимает площадь *g. sigmoideus posterior*, каудальную часть *g. sigmoideus anterior*, *g. coronalis*, верхнюю часть *g. suprasylvius anterior* и часть *g. ectosylvius* (рис. 88). Средняя величина клеток 25×40 мкм, максимальная — 60×80 мкм (гигантские пирамиды). Границы этого поля проходят на несколько миллиметров оральнее от *s. cruciatus* и по нижней трети *s. coronalis praesylvius*, сбоку и несколько ниже *s. coronalis*. Задний отдел гигантопирамидного поля располагается по *g. suprasylvius anterior*, *g. ectosylvius anterior* и частично по *g. coronalis*. Наибольшее количество клеток Беца наблюдается в районе стыка трех извилин: коронарной, передней эктосильвиевой и передней супрасильвиевой. Зона гигантопирамидного поля совпадает с областью, в которой регистрируются антидромные вызванные ответы (рис. 88, Б). Часть волокон пирамидного тракта начинается из других областей коры. В сенсорные области коры поступают импульсы разных модальностей. Наличие специфических «моторных» клеток в других воспринимающих областях объясняет возникновение ориентировочной реакции на звуковое и световое раздражение. Так, в зрительной коре (17-е поле) имеются проекционные пирамиды Мейнерта (их аксоны уходят к *pulvinar*), возбуждение которых вызывает поворот головы, и клетки Кяхала, участвующие в ориентировочном движении мышц глаза.

Общее количество кортико-спинальных волокон у кошки колеблется от 70 000 до 186 000, из них 55% миелинизированных. Разряд импульсов следует

с большой скоростью (18—70 м/с). Скорость проведения, являющаяся функцией от диаметра, неодинакова: от коры до продолговатого мозга она выше, чем на пути от продолговатого до спинного мозга, что подтверждается и при ортодромном возбуждении путей (раздражение коры), и антидромном их раздражении. Волокна пирамидного тракта, проходя через ствол мозга, отдают коллатерали к ядрам экстрапирамидной нисходящей системы — красному ядру, ядрам рети-

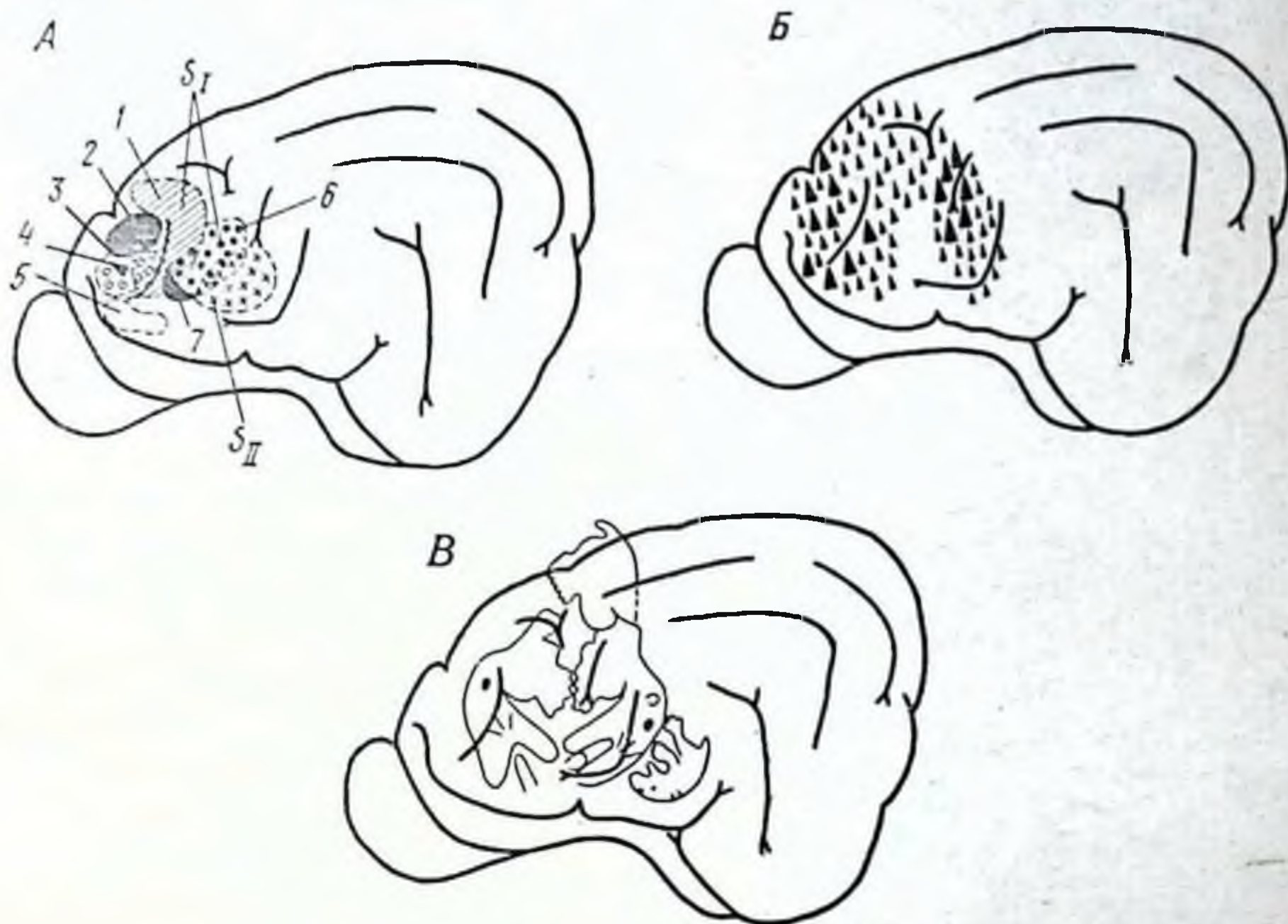


Рис. 88. Топическая организация сенсомоторной коры кошки. А — сенсорные (S_I и S_{II}) зоны и моторная, установленные антидромным раздражением пирамидного пути (по С. Terzuolo, W. Adey, 1960); Б — топография гигантопирамидного поля (по А. С. Батуеву, 1970); В — представление в моторной и сенсорной зонах (по С. Woolsey, 1956): 1 — дистальная часть задней лапы, 2 — туловище, 3 — дистальная часть передней лапы, 4 — передняя лапа, 5 — морда (моторная зона), 6 — морда (сенсорная зона), 7 — морда (инсилатеральная поверхность)

кулярной формации, сенсорным ядрам черепно-мозговых нервов, ядрам дорсальных канатиков. На уровне основания продолговатого мозга происходит перекрест этих волокон и только 10% их спускается в вентральном канатике, не перекрещиваясь. Волокна вентрального пирамидного тракта частично перекрещиваются на уровне сегментов спинного мозга.

Соматотопическая организация моторной коры подтверждена анатомическими исследованиями: удаление ростролатеральных участков (зона передних конечностей) приводит к претерминальной дегенерации, наблюдаемой в шейных и верхних грудных сегментах, а при удалении медиальных и каудальных участков (зоны задних конечностей) дегенерация наблюдается от нижних грудных до крестцовых сегментов (рис. 89). Имеется распределение в отношении дистально и проксимально расположенных мышц тела и конечностей. Ростральная часть моторной коры у кошки связана с проксимальными, а каудальная — с дистальными. При длительном электрическом раздражении области представления задней конечности последовательно регистрируется двигательная активность дистальных сгибателей пальцев, затем стопы и, наконец, бедра. ВПСП, регистрируемые в мотонейронах дистально расположенных мышц, больше, чем ВПСП,

регистрируемые в мотонейронах проксимальных мышц. Отсюда понятно, почему минимальные пороговые раздражения моторной коры вызывают возбуждение в дистальных мышцах. Такая организация коры связана с более развитым контролем за двигательной активностью дистальной мускулатуры (кисти, пальцы), позволяющей выполнять приматам сложные движения. Эта закономерность касается организации всех нисходящих двигательных путей: пирамидный и руброспинальный пути активируют дистальные мышцы (возбуждая флексоры), а более древние стволовые пути активируют проксимальные мышцы конечностей и мышцы туловища (возбуждая экстензоры).

Из всех нисходящих моторных путей только руброспинальный оканчивается там же, где и пирамидный, но он захватывает более широкое поле серого вещества спинного мозга. У кошки вестибуло-спинальные пути заканчиваются в дорсомедиальной области переднего рога и медиальной части интермедиальной области, ретикуло-спинальный — в интермедиальной зоне, тектоспинальный — латеральное ретикуло-спинального (рис. 90, А).

Распределение фокальной активности I—IV сегментов спинного мозга кошки по предельным значениям латентности реакции на стимуляцию моторной коры происходит следующим образом: нейроны наружной базиллярной области активируются моносинаптически. Активность в заднем боковом канатике появляется спустя 4,7—5,5 мс от начала стимуляции и в наружной базиллярной области через 6,4—7 мс. Терминали пирамидных волокон локализуются на дендритах нейронов наружной базиллярной области. Для внутренней базиллярной области наблюдается активирование через промежуточные нейроны. Вставочные звенья между пирамидными волокнами определяют анализ коркового сигнала при реализации его в движение (рис. 90, Б, В). Одиочная волна возбуждения, приходящая по пирамидному пути, не эффективна, но на залп импульсов всегда есть ответ. Аксоны клеток наружной базиллярной области отличаются

большой скоростью проведения возбуждения (до 60 м/с) в ряд сегментов, являясь частью проприоспинальной системы. Нейроны наружной базиллярной области имеют длительную следовую гиперполяризацию (до 100 мс), что приводит к затруднению ответа на повторные сигналы. Следовательно, через эту систему передаются фазические влияния с пирамидного тракта.

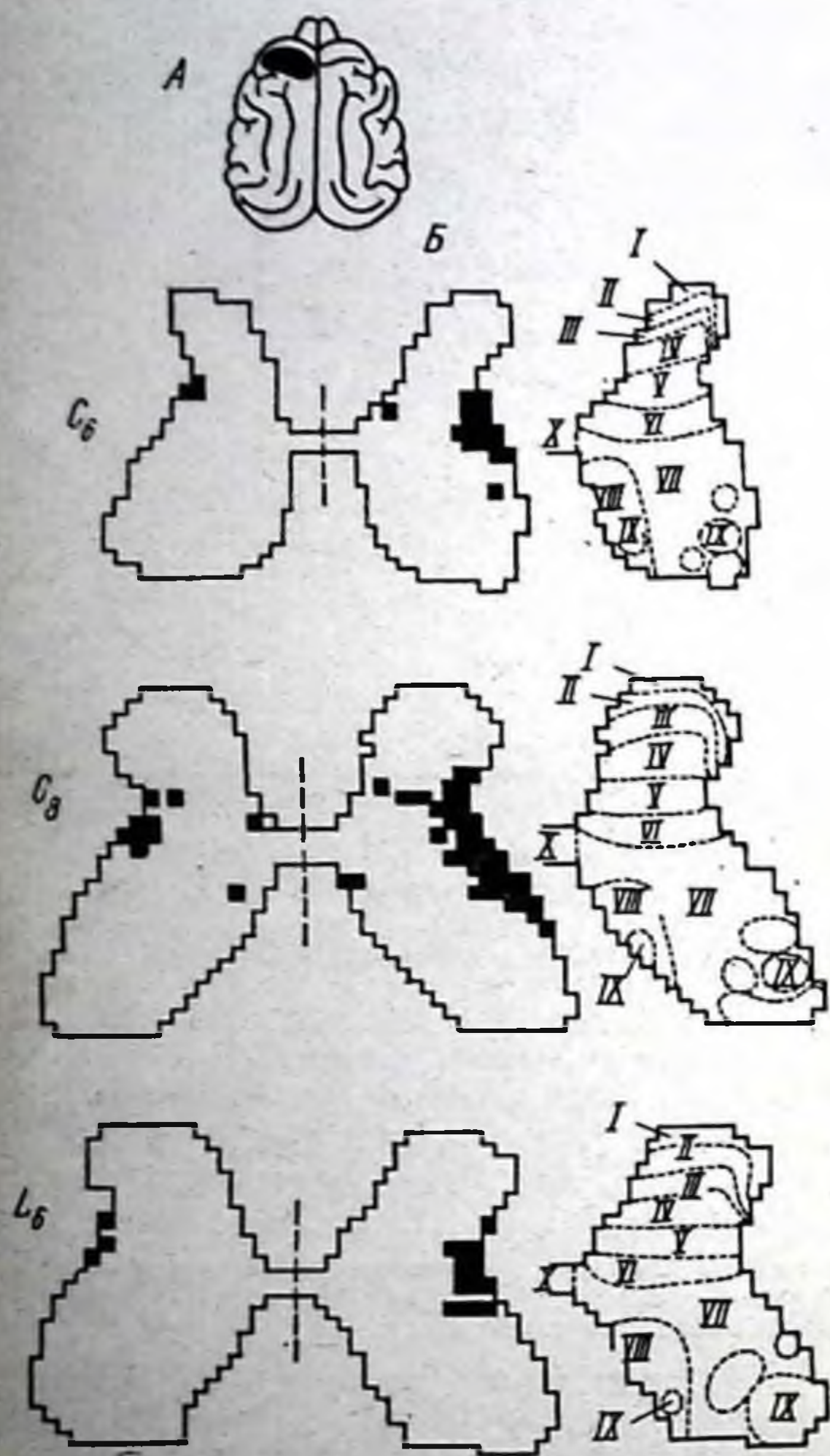


Рис. 89. Распределение претерминалей кортико-спинальных волокон в спинном мозге кошки (по П. Г. Костюку, 1973). А — область разрушения в коре (заштрихована); Б — расположение дегенерирующих претерминалей в различных сегментах спинного мозга C_6 , C_8 , L_6 (объяснение см. в тексте)

большой скоростью проведения возбуждения (до 60 м/с) в ряд сегментов, являясь частью проприоспинальной системы. Нейроны наружной базиллярной области имеют длительную следовую гиперполяризацию (до 100 мс), что приводит к затруднению ответа на повторные сигналы. Следовательно, через эту систему передаются фазические влияния с пирамидного тракта.

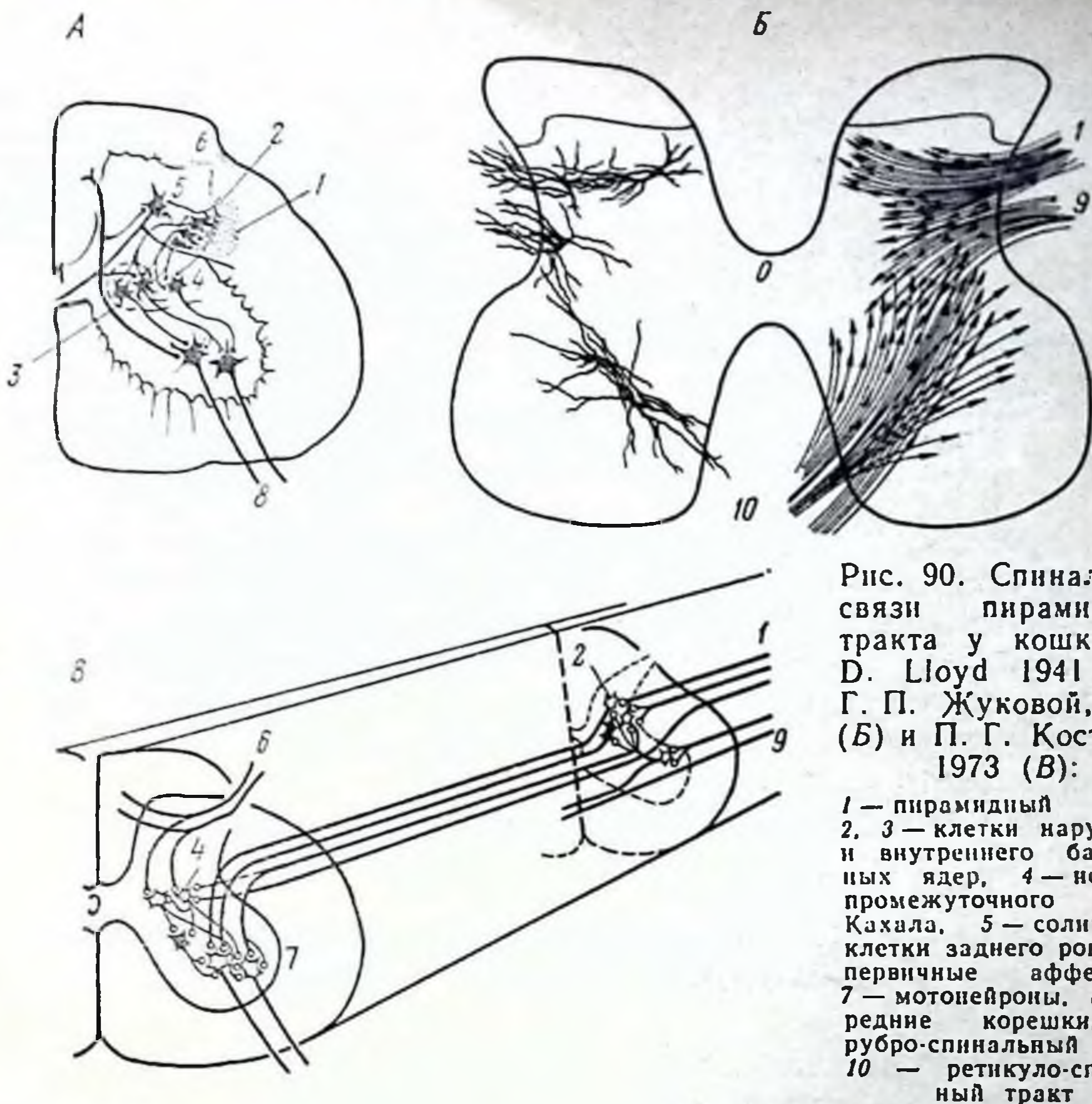


Рис. 90. Спинальные связи пирамидного тракта у кошки по D. Lloyd 1941 (А), Г. П. Жуковой, 1977 (Б) и П. Г. Костюку, 1973 (В):

1 — пирамидный тракт, 2, 3 — клетки наружного и внутреннего базиллярных ядер, 4 — нейроны промежуточного ядра Кахала, 5 — солитарные клетки заднего рога, 6 — первичные афференты, 7 — мотонейроны, 8 — передние корешки, 9 — рубро-спинальный тракт, 10 — ретикуло-спинальный тракт

Нейроны внутренней базиллярной области активируются моно- и полисинаптически, но на них поступают и афферентные сигналы с периферии. Нейроны этой системы генерируют ритмические разряды импульсов, не сопровождающиеся значительными следовыми процессами. При поступлении повторных разрядов удлиняется возбуждающее действие и создается тоническое влияние на мотонейроны.

Промежуточное ядро Кахала является третьей областью, где прослеживаются терминали пирамидных клеток. Для поясничного отдела показано, что латентный период ответа нейрона велик, но изредка регистрируются реакции моносинаптического типа. Возбуждение пирамидных клеток, не вызывая самосинаптических потенциалов, усиливает синаптические процессы мотонейронов в ответ на афферентные сигналы. Следовательно, сигналы, приходящие по пирамидным путям, должны создавать ВПСП во всех типах вставочных нейронов ядра Кахала, облегчая их ответы на афферентацию. Сегментарные вставочные нейроны ядра Кахала могут активироваться и через нейроны наружной базиллярной области.

Представления о фазическом и тоническом компонентах влияний пирамидного тракта подтверждаются при раздражении его отдельных пучков. Поскольку тонкие и толстые волокна имеют разные пороги возбудимости, то, меняя параметры раздражения, можно вызвать их раздельное возбуждение. Раздражение моторной коры стимулами низкой частоты (10—20 имп/с) приводит к возбуждению только волокон большого диаметра, распространение импульсов по которым происходит с большой скоростью, но это не ведет к значительному сдвигу ВПСП мотонейронов. Сочетание этого возбуждения с раздражением тонких

медленно проводящих волокон приводит к изменению мембранного потенциала на весь период раздражения. Сопоставление ВПСП в мотонейронах при различных путях их активации показало, что ВПСП, вызванные в мотонейронах с пирамидного тракта, лишь в небольшой их части реализуются в ПД, и эта степень реализации меньше по сравнению с возбуждением, вызванным в этих же мотонейронах, но с афферентов спинальных рефлексов. В условиях естественной деятельности, когда активность афферентных входов (сегментарных и надсегментарных) создает в мотонейронах деполяризационный фон, даже незначительные по амплитуде пирамидные ВПСП будут оказывать пусковое действие на флексоры, а ТПСП — вызывать активное торможение. Сигналы с пирамидных волокон тормозят гамма-мотонейроны экстензоров, которые были прежде возбуждены разрядами импульсов, приходящих по экстрапирамидным путям. Значит, проявляя собственные реципрокные влияния, вмешиваясь в течение реципрокных спинальных рефлексов, пирамиды включают и собственное аутовозбуждение экстензоров и торможение флексоров с Ia-афферентов экстензоров.

Цель работы. Освоить оперативные приемы экспериментальной нейрохирургии. Изучить стадии наркоза. Освоить операции трахеотомии, трепанации черепа, приемы остановки кровотечения на всех этапах операции. Используя точечные электроды для электрического раздражения, составить схематическую карту представительства отдельных групп мышц в двигательной области коры больших полушарий. Зарегистрировать вызванные потенциалы в соматосенсорной коре при раздражении чувствительных нервов передних и задних конечностей.

З а д а ч а 1. Электрическое раздражение двигательных областей коры больших полушарий кошки

Методика. Во время операции выполняют указания, приведенные в методике задачи I темы II. Используют эфирный наркоз. Для наркотизации кошку помещают под стеклянный колпак, куда положен кусочек ваты, смоченный эфиром. Тщательно следят за поведением животного, отмечая стадии наркоза. После фиксации животного на операционном столе наркоз подают через маску, а после трахеотомии — через резиновую трубку, являющуюся продолжением стеклянной трахеотомической канюли. В период сонливого состояния кошку привязывают к малому операционному столу следующим образом. При положении на спине передние лапы должны быть плотно прижаты к туловищу, задние — хорошо вытянуты, шея и грудная клетка резко выдвинуты вверх. Для этого лямки, наложенные на предплечья передних лап, проводят за спиной на противоположную сторону, где их укладывают поверх предплечья другой лапы несколько выше места прикрепления петли на второй лапе. Концы лямок одновременно сильно стягивают и закрепляют в скобках операционного стола. Задние лапы растягивают лясками в слегка отведенном положении и также фиксируют. Под шею подкладывают валик. Запрокинув голову животного назад, просовывают в рот за клыки кольцо головодержателя и хорошо закрепляют его в стойке операционного стола. После фиксации животного на операционном столе немедленно продолжают наркотизацию эфиром через маску, регулируя глубину наркоза. Для выполнения задачи необходимы тот же набор инструментов и вспо-

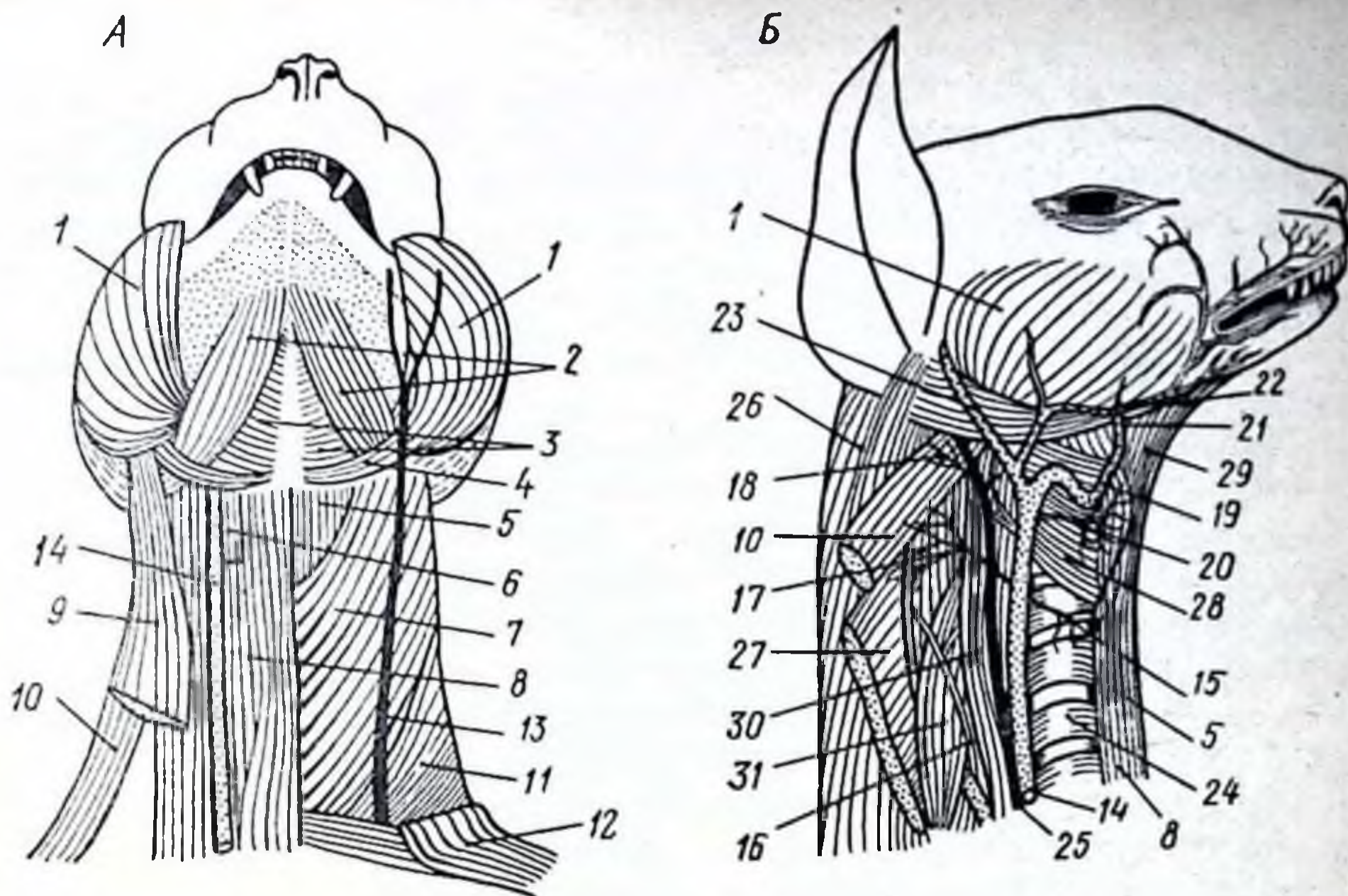


Рис. 91. Мышцы и сосуды вентральной поверхности шеи кошки. А — подкожная мускулатура (слева) и второй слой мышц (справа); Б — расположение сонной артерии и яремной вены:

1 — m. masseter, 2 — m. digastricus, 3 — m. mylohyoideus, 4 — m. stylohyoideus, 5 — m. sternohyoideus, 6 — m. thyreohyoideus, 7 — m. sternomastoideus, 8 — m. sternothyreoides, 9 — m. cleidomastoideus, 10 — m. levator scapulae ventralis, 11 — m. clavotrapezius, 12 — m. clavo-brachialis, 13 — v. jugularis externa, 14 — a. carotis communis, 15 — a. thyroideus superior, 16 — a. cervicalis ascendi, 17 — большая мышечная ветвь, 18 — a. occipitalis, 19 — a. carotis interna, 20 — глоточная ветвь, 21 — a. lingualis, 22 — a. carotis externa maxillaris, 23 — a. carotis externa, 24 — трахея, 25 — v. jugularis interna, 26 — m. splenius, 27 — m. levator scapulae, 28 — m. constrictor pharyngis medius et inferior, 29 — m. geniohyoideus et m. genioglossus, 30 — m. longus capitis, 31 — m. scolensus

могательный материал, что в задаче 1 темы II, кроме того, адреналин — 1 ампула, 2%-ный раствор новокаина (в ампулах) и аппарат искусственного дыхания.

Трахеотомия. Удаляют ножницами шерсть на передней поверхности шеи кошки. Прощупывают через кожу трахею, отличающуюся характерными хрящевыми кольцами. Скальпелем делают срединный разрез длиной 4—5 см, начиная на 1—1,5 см ниже гортани. Рассекают кожу и подкожную клетчатку. Под кожей симметрично расположен мышечный слой, покрывающий трахею и образованный из двух пар частично наложенных друг на друга мышц: сверху плотно спаянные грудино-подъязычные мышцы — m. sternohyoideus, под ними — грудино-щитовидные — m. sternothyreoides (рис. 91, А). Тупым способом отсепааровывают мышцы от кожи и подкожной клетчатки и, направляясь от средней линии латерально, отсепааровывают эти мышцы от грудино-челюстной — m. sternomastoideus.

Отведя мышцы в сторону, находят в глубине сосудисто-нервный пучок, лежащий с обеих сторон от трахеи (рис. 91, Б). В этом пучке снаружи лежит толстая внутренняя яремная вена — v. jugularis interna, ближе к трахее — сонная артерия — a. carotis, снизу к ней

плотно прилегает нервный ствол, состоящий из блуждающего и симпатического нервов. Сонную артерию с одной стороны отсепааровывают из пучка и перевязывают, а с другой — берут на лигатуру, но не перевязывают, закрепив концы лигатуры пинцетом Пеана. Затем обнажают трахею, подводят под нее толстую шелковую нитку, слегка ее приподнимают и ножницами надрезают два хрящевых кольца, чтобы разрез получился в виде буквы Т. В разрез вводят трахеотомическую трубку и завязывают лигатуру на уровне шейки трубки двойным узлом.

При необходимости трахеотомическую трубку соединяют резиновым шлангом с аппаратом искусственного дыхания. Регулируют объем подаваемого в легкие воздуха, частоту дыхания и выход воздуха из легких. Для этого на боковой отросток трубки надевают резиновый шланг и его просвет регулируют, уменьшая или увеличивая с помощью пинцета Пеана. Объем подаваемого воздуха для одного вдоха должен быть равен 200—300 мл. Эфирный наркоз следует подавать через боковой отросток трахеотомической трубки.

Трепанация черепа. Для перехода к трепанации черепа необходимо иметь следующие растворы и смеси: 3%-ный раствор перекиси водорода; теплый и горячий растворы Рингера для теплокровных; смесь пчелиного воска, парафина (по 5 частей каждого вещества) и вазелина (1 часть). Растворы подогревают на водяной бане в фарфоровых стаканах.

Убедившись, что наркоз достаточно глубок, отвязывают кошку, переворачивают ее спиной вверх и в таком положении снова крепко привязывают к операционному столу. Головодержатель снимают. Между нижней и верхней челюстями вставляют зажим Мора и закрепляют его, обмотав челюсти проволокой. Большими ножницами удаляют шерсть с залобно-теменной области. Делают скальпелем два перпендикулярных разреза кожи: один по средней линии по сагитальному гребню черепа, другой — по верхней границе ушей. Каждый лоскут кожи берут за свободный угол пинцетом Пеана и, постепенно отслаивая от фасциального апоневроза и мышц, откидывают вниз. Делают скальпелем овальные надрезы сухожилий височных мышц — *m. temporalis* и распатором отодвигают их к периферии. Поскольку эта операция болезненна и сопровождается кровотечением, ее следует проводить при дополнительной местной анестезии. Для этого мышцы, по мере их отслоения от костей черепа, периодически смачивают 2%-ным раствором новокаина с адреналином (рис. 92).

Отступая на 1 см от сагиттального гребня на уровне верхней границы ушей, просверливают трефином (или с помощью бормашины) отверстие в черепе. При сильном кровотечении перевязывают сонную артерию, натягивая для этого свободные концы заранее подведенной лигатуры. Если это не помогает, помощник хирурга двумя пальцами зажимает обе позвоночные артерии на уровне первых позвонков.

Расширяют отверстие, сделанное трефином, выкусывая щипцами кость. Вдавливанием разогретого воска в края кости и прикладыванием к ране тампонов, смоченных в растворе перекиси водорода, останавливают кровотечение. После удаления костей черепа тонкой

хирургической иглой приподнимают твердую мозговую оболочку и, не касаясь мозга, вскрывают ее глазными ножницами. При этом может возникнуть диффузное кровотечение, которое останавливают путем прикасания к поверхности мозга марлевым компрессом, смоченным горячим раствором Рингера, или тампоном, смоченным раствором H_2O_2 . Компресс или тампон оставляют на 3—5 мин. Удалив кровь с поверхности мозга, приступают к выполнению задачи. В процессе работы через каждые 10—15 мин рекомендуется закрывать на 2—3 мин мозг марлевой салфеткой, смоченной теплым раствором Рингера.

Выбор параметров раздражающего тока. На результаты стимуляции открытой поверхности коры влияют многие факторы: шунтирование тока затекающей жидкостью, расстояние между кончиками биполярных электродов и, прежде всего, параметры тех реальных токов, которые, распространяясь внутри коры, вызывают возбуждение пирамидных клеток и внутрикорковых путей. Поэтому при определении фокуса представительства в моторной зоне тех или иных мышц необходимо быть уверенным, что использованы минимальные силы раздражения. Необходимо наладить осциллографический контроль с прямым измерением силы прикладываемых стимулов или рассчитать силу тока с учетом сопротивления электродов и межэлектродного участка ткани.

При первичном поиске моторной области используют стимулятор типа ЭСЛ и частоты раздражающих стимулов 10—20 имп/с при продолжительности стимула 0,5 мс. Этот параметр имеет существенное значение. Так, при частоте 10—20 имп/с при замене коротких стимулов (0,1 мс) на продолжительные (1,0 мс) раздражение моторной области коры становится более эффективным. Это объясняется вовлечением в активность медленно проводящих пирамидных волокон. Постсинаптические процессы при раздражении длительными стимулами характеризуются стойкими деполяризационными или гиперполяризационными сдвигами мембранного потенциала мотонейронов.

Подбор силы токов при стимуляции коры макроэлектродами осуществляется с учетом результатов, полученных с помощью микроэлектродов. При микростимуляции вольфрамовыми (70 мкм) электродами определены пороги около 1,0 мА. За порог принимали силу, при которой наблюдали 50% ответов соответствующих мышц на прилагаемые

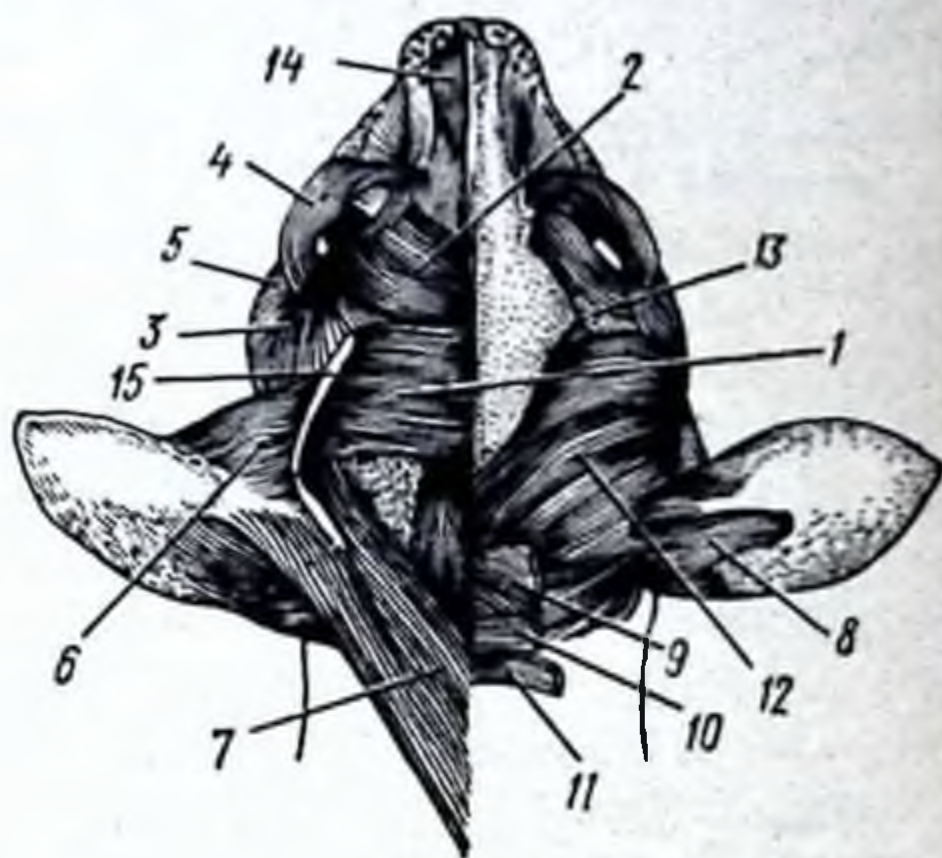


Рис. 92. Мышцы дорсальной поверхности головы кошки (слева — поверхностно расположенные, справа — глуболежащие):

1 — m. Intermedius scutulorum, 2 — m. corrigator supercilii medialis, 3 — m. corrigator supercilii lateralis, 4 — m. orbicularis oculi, 5 — m. platysma, 6 — m. adductor auris superior, 7 — m. levator auris longus, 8 — m. transversus auriculae, 9—11 — m. adductor auris longus et brevis, 12 — m. temporalis, 13 — m. frontoscutularis (перепечата), 14 — m. levator labii superioris alaeque nasi, 15 — щитовидный хрящ

стимулы. Пороги поверхностной микроstimуляции, определяемые по возбуждению клеток пирамидного тракта, равнялись 400 мкА, а по реакциям мышц — 400—600 мкА. При погружении кончика микроэлектрода до V—VI слоев моторной коры ритмическая (300 имп/с, 0.2 мс) стимуляция может вызывать непрерывные сокращения соответствующей мышцы, например мышц передней лапы кошки — *m. extensor digitorum communis* и *m. plantaris longus*. При этом пороги внутрикорковой стимуляции были в пределах от 4 до 20 мкА. При положении кончика микроэлектрода в слое пирамид коры сила тока 10 мкА достаточна для возбуждения тел мотонейронов на расстоянии 100 мкм. При макро- и микроstimуляции увеличение силы раздражающего тока приводит к вовлечению в возбуждение соседние пирамидные клетки, вызывает иррадиацию возбуждения по моторной коре, поэтому фактор силы имеет решающее значение при определении ее соматотопической организации. Не следует злоупотреблять сильными и длительными раздражениями, после которых наблюдается общее движение судорожного характера. В течение 10 мин и более кора после такого воздействия будет находиться в состоянии торможения, поэтому надпороговое раздражение этого участка не вызовет двигательной реакции. Таким образом, длительность раздражения каждой точки коры не должна превышать 1—2 с. Хотя по сравнению с лимбической корой неокортикальные структуры обладают более высоким порогом для вызова судорожной активации, ее возможно наблюдать при стимуляции током силой 0,3—1,5 мА, длительности стимула 0,15—0,5 мс, частоте стимуляции 50 имп/с и продолжительности 20—30 с (для моторной и премоторной коры обезьян) и током силой 0,98—2,2 мА при тех же остальных параметрах (для моторной и зрительной коры кролика).

Ход работы. 1. Уменьшить подачу эфира и слегка освободить конечности кошки.

2. Сделать рисунок операционного поля с видимыми извилинами и бороздами.

3. Подсушить кору, прикладывая к ней кусочки фильтровальной бумаги, и, меняя местоположение раздражающих электродов, найти точки двигательной области коры, раздражение которых приводит к движению передних и задних конечностей, головы, хвоста, век, глаз, челюстей.

4. Нанося найденные точки на нарисованную схему, получить карту представительства различных групп мышц в двигательной области коры.

5. Подсушить область коры, раздражение которой вызывает движение передней конечности, и поместить на эту точку кусочек фильтровальной бумаги 2×2 мм, смоченный 0,1%-ным раствором стрихнина.

6. Через 2—5 мин повторить раздражение. Убедиться, что после воздействия стрихнина возбудимость участка коры повышается.

7. После выполнения задачи сфотографировать операционное поле (рис. 93). На этом же животном можно провести задачу 1 темы VI.

Обработка результатов. Сопоставляют данные, полученные в нескольких группах, и составляют общую карту двигательной области

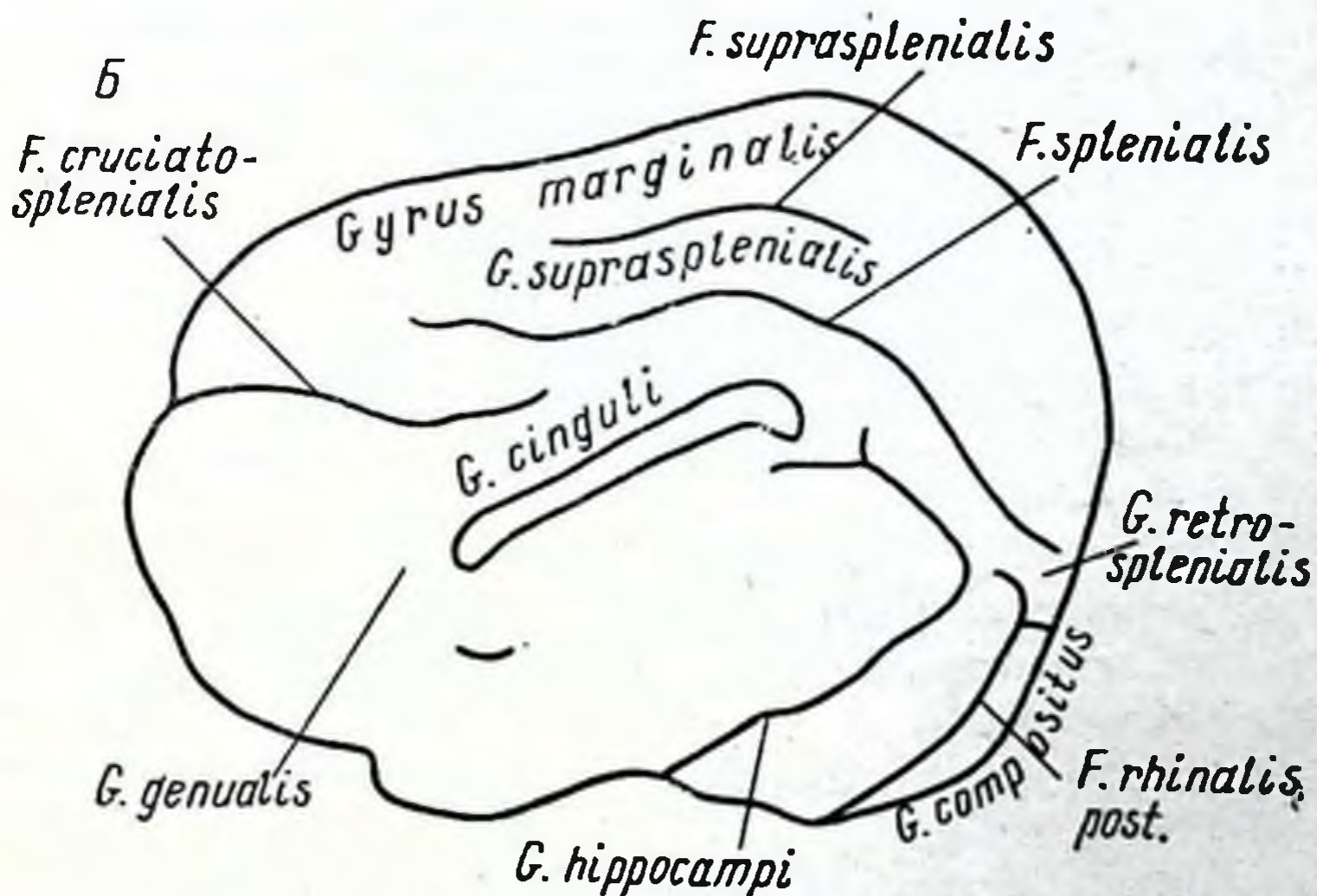
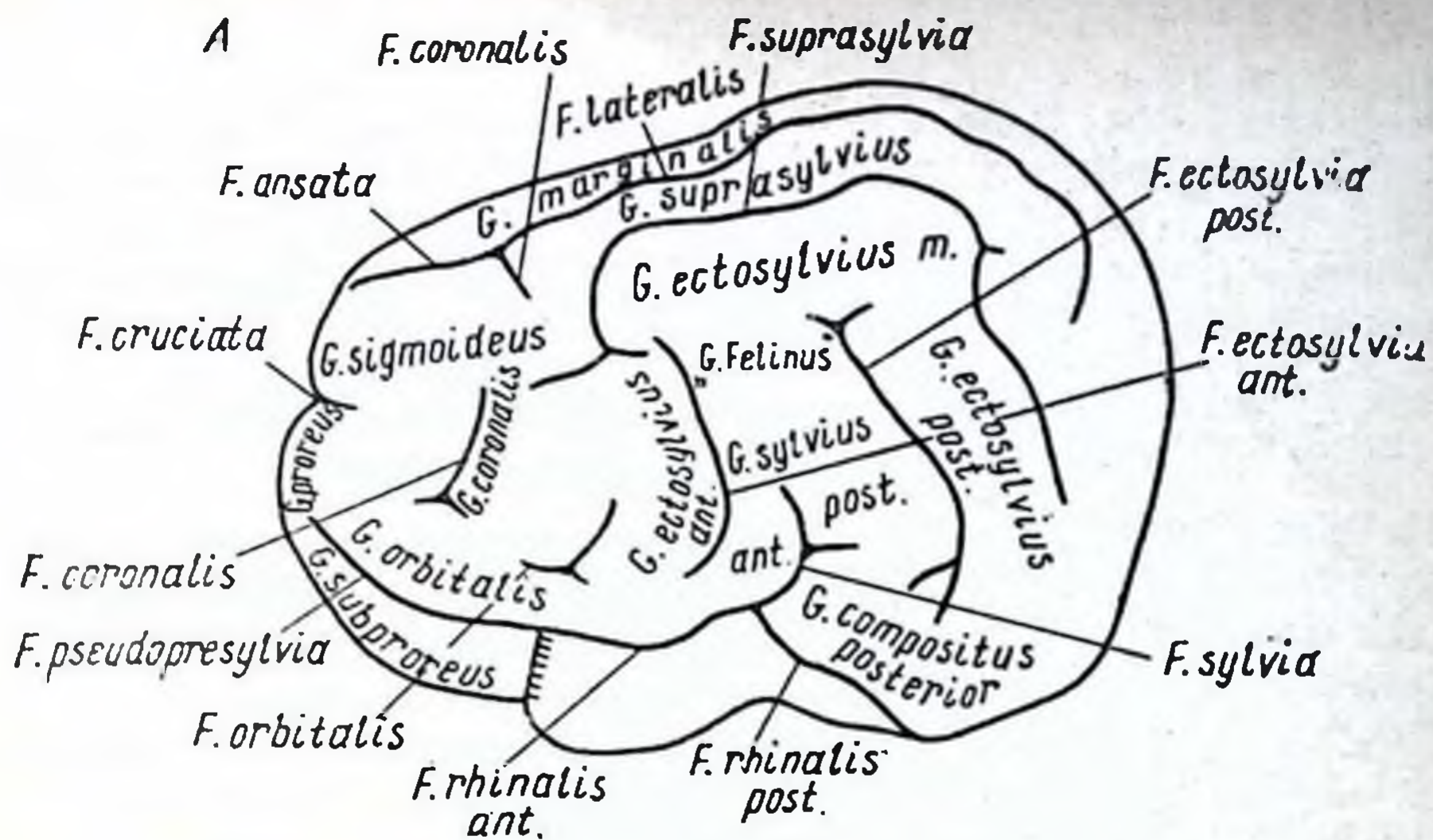


Рис. 93. Извилины и борозды коры большого мозга кошки. Вид с латеральной (A) и медиальной (Б) сторон (по S. Kreiner, 1971); В — пример морфоконтроля для составления карты моторной зоны (отмечено точками)

коры у кошки. При обсуждении результатов учитывают, что при кортикальном раздражении одного полушария можно зарегистрировать движения, требующие участия симметричной области второго полушария (например, опускание нижней челюсти), или движения, связанные с антагонистическими реакциями (боковые движения глаз), или нейтральные движения, получаемые только при раздражении коры одного полушария (движения пальцев).

Задача 2. Регистрация первичных ответов в сенсомоторной области коры кошки

Методика. Методические указания те же, что в задаче 1. После трепанации черепа голову кошки закрепляют в головодержатель стереотаксического прибора или хорошо закрепляют животное на малом операционном столе. Для регистрации первичных ответов используют электроды, изготовленные из серебряных проволочек с шариками на концах. Электроды укрепляют на костях черепа с помощью двух коротких винтов. Установка включает осциллограф типа С1-16, стимулятор типа ЭСЛ-2 и УБП. Животное помещают в экранированную камеру. Вызванные потенциалы с экрана осциллографа фотографируют с помощью фотоаппарата типа «Зенит-3М» или фоторегистрирующего устройства ФОР-3.

Для раздражения выпрепаровывают седалищный нерв (см. рис. 79). Раздражают нерв с помощью погружных никелиновых электродов. После окончания операции по трепанации черепа (но до вскрытия твердой мозговой оболочки) и препаровки седалищного нерва делают перерыв на 15—20 мин, после чего вводят животному хлоралозу в дозе 80 мг/кг.

Ход работы. 1. Вскрыть твердую мозговую оболочку.

2. Подвести раздражающие электроды под седалищный нерв.

3. Подсушив поверхность коры, наложить на ее поверхность регистрирующие электроды.

4. Раздражая седалищный нерв, регистрировать с экрана осциллографа первичные ответы.

5. Меняя силу и частоту раздражения, найти фокус максимальной амплитуды вызванных ответов.

Обработка результатов. При обсуждении результатов следует помнить, что в определенных условиях помимо первичных ответов регистрируются вторичные ответы ассоциативных областей коры (у кошки с латеральной и супрасильвиевой извилинах). Рекомендуется сравнить изменения первичных ответов при различных видах наркоза.

Рекомендуемая литература: [6] — гл. VI, с. 118—139; [32] — с. 8, 42, 76, 120, 181, 224; [61] — с. 194—232; [66] — с. 450—488, 558—582; [13] — с. 304—317; [22] — с. 99—146; [46] — с. 455—480; [60].

ТЕМА VI. ЯВЛЕНИЕ ДЕЦЕРЕБРАЦИОННОЙ РИГИДНОСТИ. ШЕЙНЫЕ И ЛАБИРИНТНЫЕ РЕФЛЕКСЫ

Наряду с приемами микрокоагуляции и микрораздражения различных областей мозга, перерезки на разных уровнях ЦНС позволяют изучить отдельные структуры головного мозга и целые системы мозговых образований, давая

возможность выявить взаимосвязи различных отделов мозга. К числу наиболее известных перерезок мозга относится *интерколликкулярная перерезка*, т. е. пересечение на уровне среднего мозга (по буграм четверохолмия), позволяющая продемонстрировать закономерности регуляции позы. Следствием интерколликкулярной перерезки является развитие *децеребрационной ригидности*, в результате которой у животного не сгибаются конечности и хвост, голова запрокидывается назад (опистотонус). Проявление ригидности у разных животных различно и может выражаться в усилении как экстензорного, так и флексорного тонуса в связи с особенностями настройки центральных механизмов, с экологическими и другими признаками. Для большинства животных — это усиление активности антигравитационной мускулатуры.

Рефлекторный аппарат, ответственный за тоническую регуляцию, формируется в онтогенезе. На ранних стадиях зародышевого развития наблюдаются толчкообразные движения, но с развитием структур среднего мозга, установлением его нисходящих связей с продолговатым и спинным движения становятся тоническими, затяжными. Возможность возникновения *децеребрационной ригидности* после пересечения у новорожденного животного зависит от формирования рефлексов позы и стояния. Так, у слепорожденных кроликов ригидность может быть получена только с 12-го дня рождения, у рождающихся зрячими — морских свинок — с 1-го дня и даже за 3—5 дней до рождения; у новорожденных котят стойкая *децеребрационная ригидность* наступает с 10—12-го дня жизни. Это связано также с развитием *вестибулярных и статокинетических рефлексов*.

Децеребрационная ригидность является рефлекторным процессом и поддерживается импульсами из ряда источников. Это доказывается экспериментальным путем. 1. Перерезка задних корешков, снимающая афферентацию с проприорецепторов, или блокирование последних (рефлекс растяжения) резко ослабляет ригидность именно той конечности, корешки которой перерезаны. 2. Разрушение вестибулярных ядер или перерезка ниже красного ядра резко уменьшает ригидность (вестибулярные тонические рефлексы). 3. Важную роль играет афферентация с рецепторов шейных тонических рефлексов.

Решающую роль в генезе ригидности играют связи красного ядра. Участие его объясняли по-разному. Предполагали, что перерезка является сильным раздражителем, вызывающим первоначальное перевозбуждение нервных путей из красного ядра. Кроме того, при перерезке нарушаются связи красного ядра с ретикулярной формацией верхней части продолговатого мозга, а именно через ретикулярную формацию передается значительная часть торможения тонической экстензорной деятельности. Прямое раздражение ретикулярной формации приводит к ослаблению или подавлению *децеребрационной ригидности*. Красные ядра в условиях целостной работы мозга тормозят *тонические антигравитационные экстензорные рефлексы*. Эти влияния возникают на основе афферентации к нейронам красного ядра со стороны мозжечка и, возможно, коры больших полушарий, и на уровне красного ядра происходит интеграция корковых и мозжечковых сигналов. Зарегистрирована постоянная тоническая активность нейронов красного ядра. Прямое раздражение красного ядра вызывает появление ТПСР в мотонейронах разгибателей и ВПСР в мотонейронах сгибателей. Таким образом, руброспинальная система волокон оказывает такие же влияния, как и пирамидная система: она преимущественно тормозит мотонейроны экстензоров и облегчает мотонейроны флексоров. Напротив, по вестибуло-спинальным путям моносинаптически поступают влияния, облегчающие мотонейроны экстензоров.

Таким образом, в результате пересечения среднего мозга между буграми четверохолмия устраняются тормозные механизмы со стороны красного ядра, в связи с чем соотношение различных нисходящих влияний, участвующих в интеграции супраспинальной регуляции тонуса, нарушается.

Цель работы. Освоить операцию по «интерколликкулярной» перерезке, приводящей к *децеребрационной ригидности*. Показать шейные и лабиринтные рефлексы по Магнусу на ригидной кошке. Провести морфологический контроль для точного определения места перерезки на сагиттальном срезе мозга.

З а д а ч а. Перерезка ствола головного мозга на уровне бугров четверохолмия для выявления шейных и лабиринтных рефлексов

Методика. Методически удобно выполнять эту задачу сразу после окончания задачи I темы V. Поскольку для выполнения первой задачи открывали только передние области полушарий, необходимо расши-

рить доступ к поверхности мозга, вскрывая теменные кости с обеих сторон до тенториума. Перед операцией децеребрации, т. е. самой перерезки, необходимо усилить эфирный наркоз, закрыть операционную рану на шее пинцетом Пеана, освободить конечности животного. Следует заранее включить дополнительное освещение для фотографирования.

Ход работы. 1. Ввести шпатель или глазной скальпель за большие полушария мозга.

2. Осторожно надавить шпателем на мозг у конца тенториума. Если при этом вздрагивают конечности, значит шпатель ориентирован правильно (рис. 94).

3. Перевести шпатель в положение, перпендикулярное оси мозга, и одним резким движением сделать перерезку, которая должна пройти между буграми четверохолмия.

В зависимости от степени наркоза и точности перерезки децеребрационная ригидность развивается сразу после перерезки или спустя несколько минут и длится не более 5—10 мин. За это время следует сфотографировать основные характерные позы животного после перерезки: стояние на вытянутых конечностях с поднятым хвостом и запрокинутой головой.

4. Отметить изменение тонуса мускулатуры при следующих пассивных движениях головы: вверх, вниз, вправо, влево, вверх с пово-

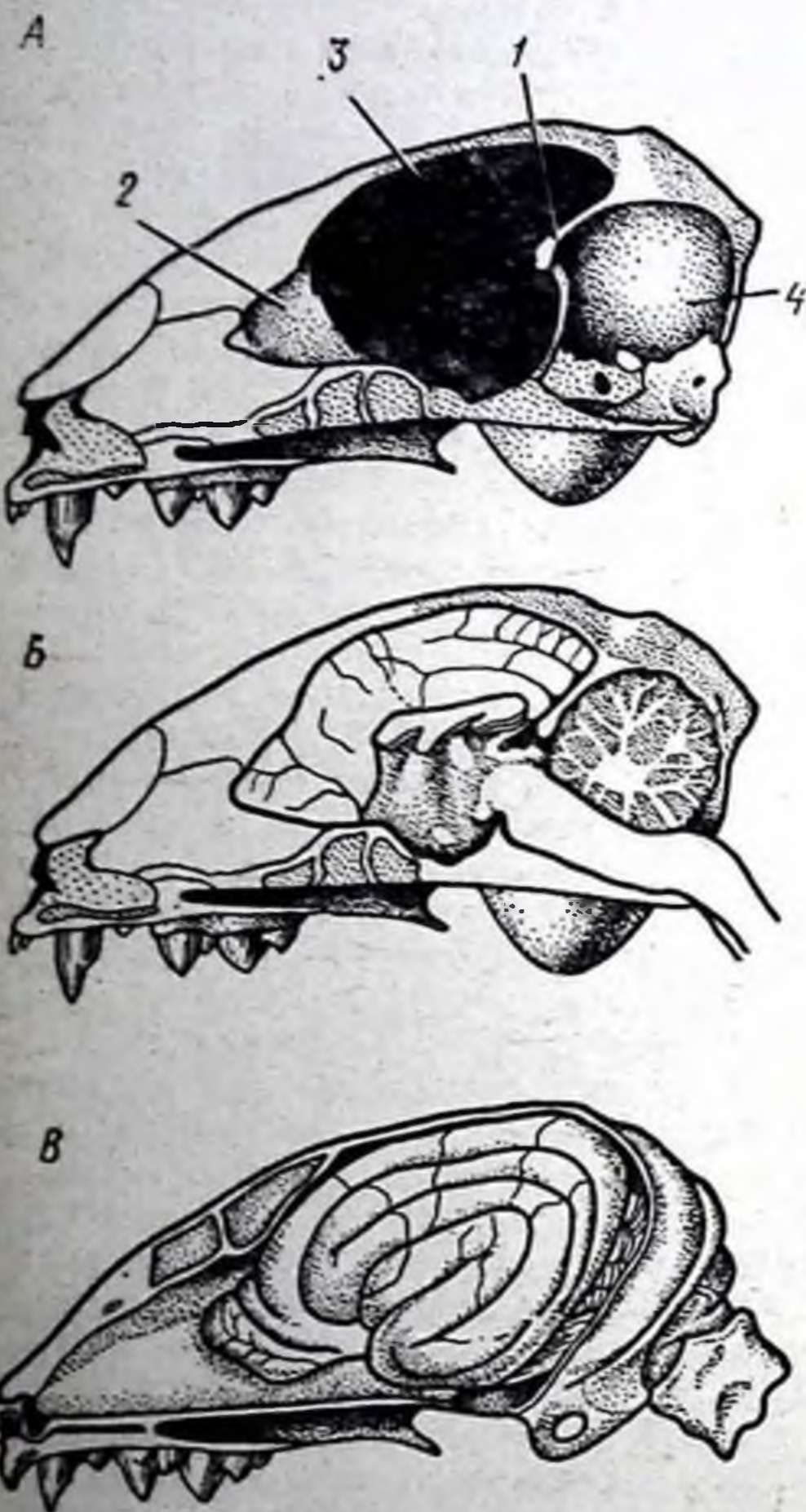


Рис. 94. Анатомическое обоснование подходов к операции по интерколликкулярной перерезке. А, Б — сагиттальный разрез черепа и мозга; В — положение больших полушарий и обонятельной луковицы в черепе:

1 — тенториум, 2 — обонятельная ямка, 3 — мозговая ямка, 4 — мозжечковая ямка

ротом по оси вправо и влево, вниз с поворотом по оси вправо и влево. При этом происходит перераспределение тонуса мышц: при повороте головы вправо увеличивается тонус разгибателей правой передней конечности и одновременно снижается тонус разгибателей левой

передней конечности; отчетливо наблюдается изменение тонуса при опускании или резком поднятии головы.

Шейные и лабиринтные рефлекторные реакции возникают при изменении положения головы животного. Состояние ригидности — удобный фон, на котором отчетливо выявляется перераспределение тонуса при влиянии афферентных сигналов с рецепторов мышц шеи и лабиринтов. Вызов шейных и лабиринтных рефлексов соответственно зависит от всякого рода побочных раздражений. Современное толкование этих феноменов таково: вестибуло-мотонейронные связи не настолько эффективны сами по себе, чтобы вызывать разряд мотонейрона и соответственно последующее движение, но создаваемая ими стойкая деполаризация мембраны мотонейрона должна существенно повышать эффективность всех других возбуждающих синаптических влияний и, в частности, влияний проприоцептивных афферентов Ia от мышечных рецепторов мышц экстензоров.

Морфологический контроль. С целью уточнения схемы двигательной области коры больших полушарий, составленной в задаче I темы V, и для уточнения области перерезки головной мозг кошки фиксируют в 10%-ном растворе формалина. Для этого в формалин помещают сначала мозг животного вместе с черепом на 3—4 суток. После уплотнения мозговой ткани головной мозг выделяют из черепа, причем сначала освобождают переднюю часть мозга (перед перерезкой), затем удаляют тенториум и затылочную кость, и только после этого выделяют задние бугры четверохолмия, мозжечок и продолговатый мозг. Мозг, завернутый в марлю, вновь помещают на сутки в формалин, после чего проводят морфологический контроль: делают фотографии общего вида мозга сверху и сбоку. Затем производят его сагиттальный разрез и фотографируют область перерезки. На сагиттальном срезе определяют точность выполнения перерезки. На микротоме делают фронтальные срезы мозга, используя в качестве заморозки хлористый этил. Для приготовления таких срезов берут участок стволовой части мозга под буграми четверохолмия. Срезы фотографируют и определяют локализацию красного ядра по отношению к линии перерезки. Дополнительно можно сделать продольный срез в области красного ядра с целью показать глубину расположения этой структуры.

Обработка результатов. Представляют рисунки поперечного среза мозга и схемы шейных и лабиринтных рефлексов, фотографии животного в состоянии децеребрационной ригидности и данные морфологического контроля.

Рекомендуемая литература: [32]; [38]; [37] — с. 65—104; [35] — т. 2, с. 473—478.

ТЕМА VII. РОЛЬ ВОСХОДЯЩИХ ВЛИЯНИЙ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ БОДРСТВУЮЩЕГО СОСТОЯНИЯ КОРЫ

У человека и млекопитающих при бодрствовании и сне регистрируются разные ритмы в ЭЭГ. Высоковольтная низкочастотная активность (*период синхронизации*), регистрируемая во время сна, сменяется низковольтной быстрой активностью (*период десинхронизации*) в момент пробуждения и при бодрствовании. Следовательно, афферентные раздражения нарушают синхронизованную активность и наступает десинхронизация мозговых ритмов. Такие комплексные состояния организма, как «настороженность», «бодрствование», «покой»,

При перерезке спинного мозга у кошки на уровне 1-го шейного сегмента у животного в ЭЭГ будет преобладать картина бодрствования. В этих условиях эксперимента головной мозг отделен от спинного, поэтому такой препарат называется *encéphale isolé*. У животного сохраняется связь мозга с черепно-мозговыми

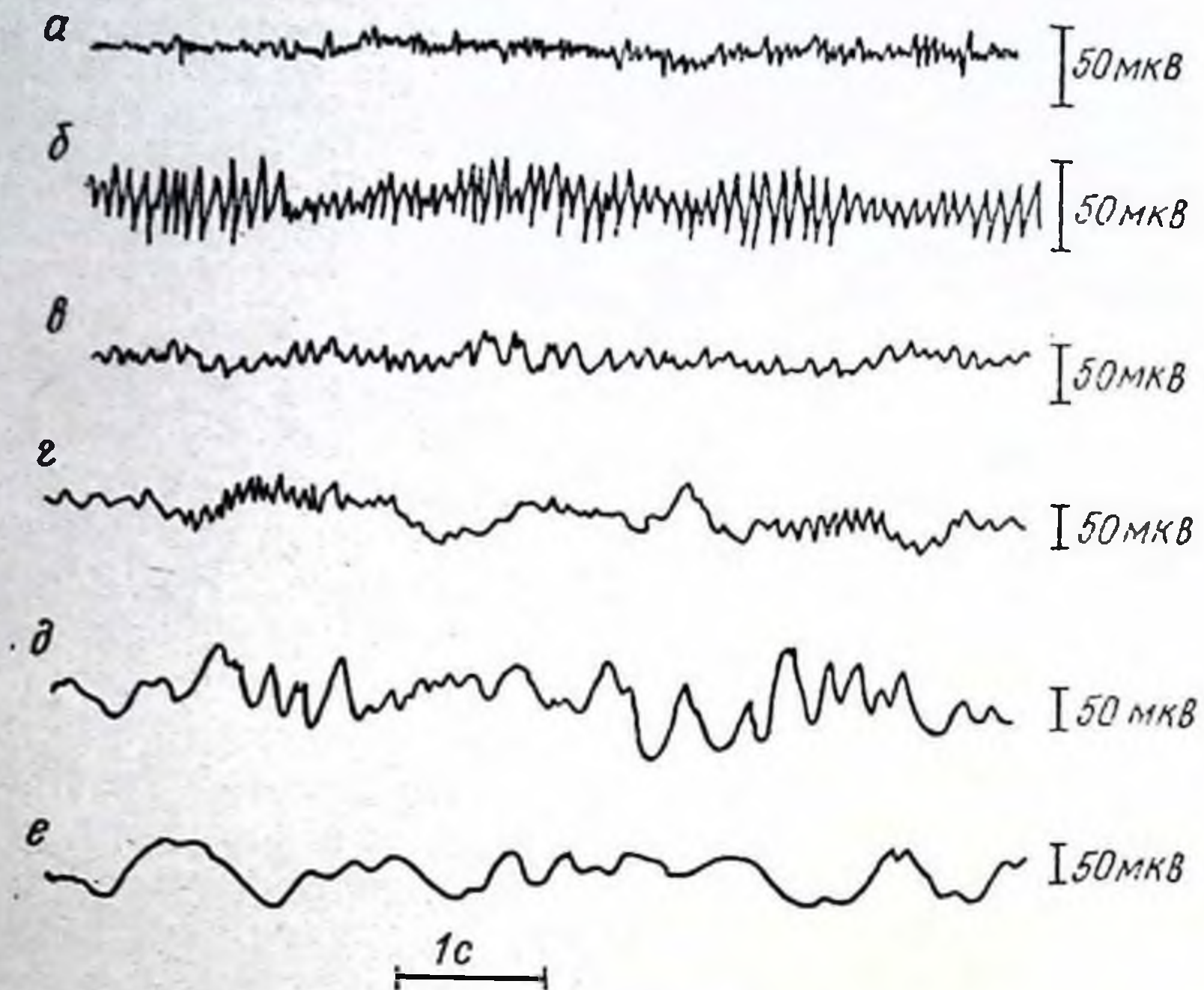


Рис. 95. Типичные ЭЭГ человека при различных уровнях активности и состоянии комы (по Г. Пенфилду и Х. Джасперу, 1958):

а — возбуждение, б — покой, в — дремота, г — сон, д — глубокий сон, е — кома

нервами, и поступающий по ним афферентный поток, видимо, способствует поддержанию коры в бодрствующем состоянии. При перерезке на уровне среднего мозга (препарат *cerveau isolé*) ЭЭГ приобретает вид, характерный для состояния сна — наблюдается медленноволновая активность (рис. 96) и у животных суживаются зрачки.

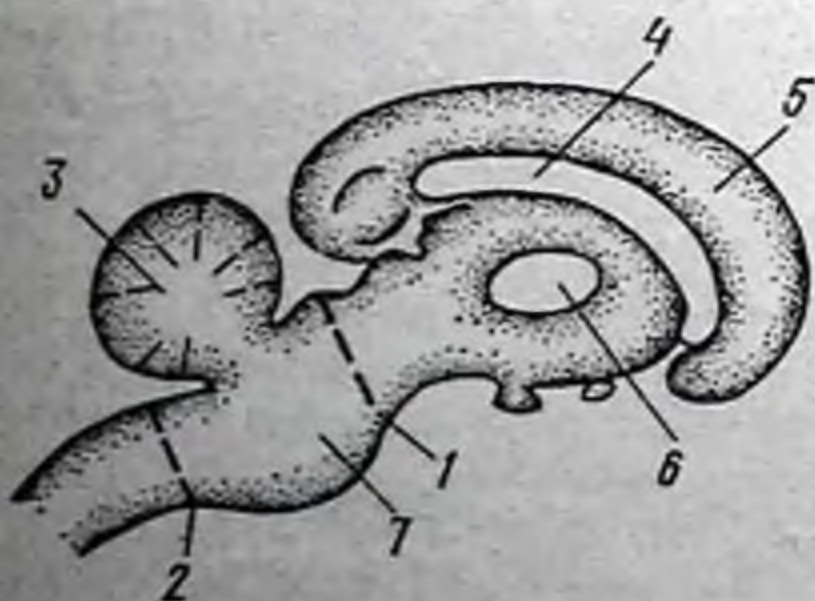


Рис. 96. Ствол мозга кошки с местами перерезки для получения препаратов *cerveau isolé* (1) и *encéphale isolé* (2) (по П. Милнеру, 1973):

3 — мозжечок, 4 — мозолистое тело, 5 — кора, 6 — таламус, 7 — варолиев мост

Электроэнцефалогическую картину пробуждения получают электрической стимуляцией ретикулярной формации (РФ) ствола мозга. Влияния РФ осуществляются по восходящим нервным путям, отличным от классических сенсорных путей, проходящих к коре через неспецифические медиальные ядра таламуса, они распространяются по экстраlemnисковым путям, т. е. по активирующей восходящей РФ. Электроэнцефалографическая и поведенческая картина сна у животного с перерезкой на уровне среднего мозга (*cerveau isolé*) обусловлена исключением пробуждающего влияния восходящей активирующей РФ.

При разрушении РФ среднего мозга и сохранении классических сенсорных путей реакцию пробуждения не удастся зарегистрировать на препарате *sevréan isolé*.

Электрическое раздражение РФ у животного, находящегося в состоянии легкого наркотического сна (при введении хлоралозы), или на препарате *sevréan isolé* вызывает изменение медленноволновой высокоамплитудной активности, которая сменяется быстрой низкоамплитудной, характерной для состояния бодрствования. Эти изменения остаются спустя значительное время после прекращения раздражения. Реакции пробуждения, вызванные естественным путем и раздражением РФ, не отличаются ни по поведенческим показателям, ни по электрофизиологическим параметрам. Эффект пробуждения может быть получен при раздражении участка ствола мозга, который распространяется от бульбарного уровня через мост и покрывку среднего мозга к нижним областям таламуса.

На нейронах РФ ствола мозга образуют синапсы коллатерали, отходящие от главных сенсорных путей. Они отходят от сенсорных волокон слуховой системы, висцерального ядра солитарного тракта, вестибулярных ядер, ядер тройничного нерва. Именно этим можно объяснить тот факт, что низкоамплитудная быстрая ЭЭГ, возникающая в ответ на естественные стимулы многих сенсорных модальностей, сходна с активностью, возникающей при раздражении РФ. Следовательно, в РФ поступают импульсы по специфическим афферентным волокнам и затем они передаются в кору. Афферентация, приходящая в кору через РФ, отличается от специфической активности тем, что она утрачивает сенсорную модальность, поскольку проекции РФ на кору несколько диффузны и ответы возникают не только в тех областях, которые специфичны для того рецептора, откуда приходят импульсы. Кроме того, часто импульсы, возникающие в разных органах чувств, воздействуют на один и тот же ретикулярный нейрон. Следовательно, функцией РФ является не различение модальностей сенсорного раздражения, а создание условий для сознательного восприятия сигнала, поступающего по специфическим афферентам. Видимо, РФ приводит кору в состояние активации, которое можно определить как «внимание». Стимуляция РФ приводит к значительному облегчению ответов на зрительные, слуховые и соматические раздражения.

З а д а ч а 1. Регистрация ЭГ-активности коры головного мозга кошки в условиях препарата *encéphale isolé*

Методика. Используют набор хирургических инструментов (задача I темы II). Животное готовят к операции, как описано в задаче I темы V. Сначала проводят операцию трахеотомии, затем открывают поверхность черепа. Отличие заключается в том, что после трахеотомии кошку помещают в стереотаксический прибор, проверив при этом глубину наркотического сна: зрачки сужены, тонус мускулатуры снижен, реакции на умеренные болевые раздражения отсутствуют. Голову кошки закрепляют в стереотаксическом приборе симметрично. Сначала вводят стержни головодержателя в слуховые проходы: оттягивают ушные раковины назад и вверх, вводят ушные стержни в начало слухового прохода до упора, затем стержень фиксируют, при этом он принимает горизонтальное положение в костном канале. Ушные держатели введены правильно, если голова кошки при нажатии на носовую часть опускается вниз, а при отпуске производит качательные движения. Дополнительно голову фиксируют с помощью держателя нижней челюсти и носовым фиксатором, который плотно укрепляют на переносице животного. Обнажают поверхность черепа,

протирают кость перекисью водорода и подсушивают эфиром или спиртом.

На черепе намечают точки, где будут сделаны трепанационные отверстия. Они должны отстоять от сагиттального шва не менее чем на 5—8 мм на расстоянии друг от друга 8—10 мм. Располагают электроды вдоль сагиттального шва в лобной, теменной и затылочной областях черепа. Отверстия просверливают бором, диаметр которого не превышает диаметр отводящих электродов. Трепанационное отверстие не должно выходить за пределы кости.

Увеличивают кожный разрез таким образом, чтобы он заканчивался на шее ниже 1-го позвонка на 2—3 см. Находят затылочный гребень, сепаруют мышцы между затылочным гребнем и 1-м позвонком по средней линии и отсекают их от гребня. Освободив подходы к затылочному отверстию, не вскрывая твердую мозговую оболочку, животное переносят вместе со стереотаксическим прибором в экранированную камеру.

В качестве электродов используют инъекционные иглы с припаянными к ним проводами. Применяют монополярное отведение, закрепив индифферентный электрод на мышцах головы, или биполярное отведение. ЭГ-активность мозга кошки регистрируют на 4-канальном электроэнцефалографе. Отводящие электроды закрепляют на кости черепа и соединяют их с распределительным щитком электроэнцефалографа. Поскольку в задаче пересекают спинной мозг на уровне 1-го позвонка, используют аппарат искусственного дыхания, который подключают к трахеотомической трубке непосредственно перед перерезкой мозга. Животное помещают на теплую грелку и постоянно следят за глубиной эфирного наркоза.

Ход работы. 1. Зарегистрировать активность мозга кошки и наблюдать ее изменения при углублении и ослаблении эфирного наркоза.

2. Внести в камеру инструменты, необходимые для перерезки спинного мозга (глазные ножницы, стеклянный крючок, фидер), а также горячий физиологический раствор и ватные тампоны. Вскрыть твердую мозговую оболочку.

3. Перевести животное на искусственное дыхание.

4. Углубить наркоз, подвести под спинной мозг фидер (внутри твердой мозговой оболочки) и быстрым движением глазных ножниц пересечь спинной мозг. Вывести через разрез фидер, закрыть рану тампоном, смоченным теплым физиологическим раствором, и немедленно приступить к регистрации ЭЭГ.

5. Зарегистрировать электрическую активность препарата *encephale isolé*, наблюдая за общим состоянием животного. Описать в протоколе поведенческие реакции: движение глаз, шевеление усами и ушами, облизывание. В ЭЭГ отметить ритмы, характерные для бодрствующего состояния мозга.

Обработка результатов. Анализируют полученные ЭЭГ интактного животного и после перерезки спинного мозга. Записи, полученные на интактном животном при разной глубине наркоза, должны помочь оценить уровни сна и бодрствования после отделения головного мозга от спинного. Выборочно просчитывают ритмы ЭЭГ интактного живот-

ного непосредственно перед перерезкой и ритмы электрической активности препарата *encéphale isolé*. Проводят морфологический контроль перерезки.

Задача 2. Регистрация электрической активности мозга кошки в условиях препарата *cerveau isolé*

Методика. Эту задачу выполняют непосредственно после 40—50 мин регистрации ЭГ-активности кошки в условиях препарата *encéphale isolé*. Часть электродов, расположенных в затылочной области, снимают; с помощью бормашины или трепана просверливают отверстие в черепе перед затылочным бугром над тенториумом (см. рис. 94), и с помощью костных кусачек вскрывают череп таким образом, чтобы шпатель прошел по тенториуму до основания мозга, в результате чего будет пересечен мозг между буграми четверохолмия (см. задачу 1 темы VI). Поскольку кровотечение при этой операции неизбежно (повреждается венозный синус), вскрытие черепа необходимо делать как можно быстрее, останавливая кровотечение тампонами, смоченными горячим физиологическим раствором.

Ход работы. 1. Записать электрическую активность мозга кошки в условиях препарата *encéphale isolé*.

2. Рассечь мозг на уровне бугров четверохолмия шпателем или глазным скальпелем: в отверстие черепа ввести инструмент, который скользит сначала под углом к основанию черепа по тенториуму, затем вертикально вниз. Как только конец инструмента коснется основания черепа, извлечь его, рану закрыть тампоном и немедленно начать регистрировать ЭЭГ.

3. Регистрировать активность препарата *cerveau isolé*. При условии правильно проведенной операции будет регистрироваться активность, характерная для состояния сна животного.

Обработка результатов. Результаты опыта анализируют так же, как и в задаче 1 данной темы.

Рекомендуемая литература: [43] — с. 91—112; [12] — с. 204—224; [36] — с. 317; [1] — с. 428—442; [66] — с. 81—96, 583—601.

ТЕМА VIII. ФУНКЦИИ МОЗЖЕЧКА

Мозжечок делится на три основные части: древнюю (вестибулярную), старую (спинальную) и новую (понтоцеребеллярную). Последняя связана с корой большого мозга через ядра моста.

Клинические наблюдения, проведенные на людях с опухолями различных отделов мозжечка, подтверждают его деление на древний, старый и новый. Так, нарушения, связанные с вестибулярной рецепцией, наблюдали при поражении заднего червя. Такие больные не могут поддерживать равновесия, им трудно стоять, передвигаться. В то же время динамические пробы (пальце-носовая) выполняются хорошо. Поражения в области переднего червя вызывают туловищную атаксию, нарушение походки (больные ходят с широко расставленными и выпрямленными ногами), асинергию при вставании, когда любой переход в сидячее положение или вставание для них затруднены (проба Бабинского). Поражение полушарий мозжечка вызывает гипотонию, отклонение при ходьбе от прямой линии, нарушение пальце-носовой и коленно-пяточной проб. Наблюдаются атония, атаксия, астазия и асинергия, интенционное дрожание пальцев и

другие симптомы. Соматотопия опухоли определяет расстройства координации той или другой конечности.

Преобладание корково-мозжечковых связей у приматов приводит к тому, что при повреждениях мозжечка у них наблюдается гипотония мышц, а у низших млекопитающих — экстензорная гипертония. Расстройства двигательной функции и координации движений, нарушение автоматизированных и произвольных двигательных актов связано с изменениями в механизме координации спинного мозга, в экстрапирамидной системе, а также с изменениями в пирамидной системе, не имеющей облегчающих воздействий после удаления мозжечка, вследствие отсутствия взаимодействия пирамидной системы и мозжечковых влияний на уровне ствола мозга. Основные механизмы компенсации определяются корковыми проекциями, их ведущей ролью в системе управления движениями.

Каждая часть мозжечка связана с соответствующими областями мозга афферентными и эфферентными путями, которые достаточно хорошо изучены.

Тормозные эффекты коры мозжечка, осуществляемые по единому эффекторному выходу — аксонам клеток Пуркине, — находятся под тормозным контролем со стороны других клеток, к которым клетки Пуркине также посылают возвратные коллатерали, тормозя системы тормозного контроля. Сложная система взаимных торможений в пределах коры существует для обеспечения строго соматотопического тормозного влияния на системы вестибулярного и двигательного анализаторов на уровне ствола головного мозга. Мозжечок посылает только тормозные влияния (к внутримозжечковым ядрам, вестибулярному ядру и др.), следовательно, его хирургическое удаление будет означать снятие торможения и возникновение облегчения во многих звеньях вестибулярного и двигательного анализаторов вплоть до коры головного мозга, куда идут сигналы от мозжечка по полисинаптическим путям. Классический метод оперативного вмешательства с полным или частичным удалением коры мозжечка представляет большой интерес на уровне изучения целых систем регуляции.

Временные изменения различных симптомов зависят от тяжести операции, количества удаленного мозжечкового вещества и степени повреждения связей мозжечка. По Л. Лучиани, выделяют следующие периоды после полного хирургического удаления мозжечка у собак: 1. Динамический период или высвобождение, характеризующийся ригидностью передних конечностей и опистотонусом (продолжается около недели). 2. Период недостаточности, характеризующийся астенией, астазией, атонией и атаксией (от 2 до 4 недель). 3. Восстановительный период, характеризующийся компенсацией функций (начинается через месяц после операции).

Указанные временные соотношения условны. Так, при поражении мозжечка рентгеновскими лучами первый период длится всего несколько часов, а иногда совсем отсутствует. Второй — 2—3 суток, а компенсация начинается с 7—10-го дня. Неодинаковы эти периоды у различных собак даже при одном типе операций.

Цель работы. Провести в стерильных условиях операцию удаления мозжечка у собаки (полностью или какой-либо доли). В процессе выхаживания животного наблюдать изменения мышечного тонуса, позы и координации движений весь период восстановления и компенсации функции мозжечка (сроки выхаживания 3—4 недели). Провести фотографирование или киносъемку специфических мозжечковых расстройств, морфологический контроль, макро- и микрогистологическое изучение оставшихся после операции структур заднего мозга.

Задача 1. Хирургическое удаление мозжечка у собаки

Ход работы. 1. Выполнение задачи складывается из трех этапов.

1. Подготовительный — стерилизация операционной, оперативного материала (ватные тампоны, марлевые салфетки), халатов, шапочек, масок; подбор комплекта инструментов для операции и его стерилизация (в день операции);

выбор животного и его подготовка. 2. Проведение операции, вывод животного из состояния наркоза, наблюдение за животным в ближайшем послеоперационном периоде. 3. Выхаживание животного, наблюдение компенсации функций. Морфологический контроль.

Подготовительный этап. Начать подготовку к операции накануне назначенного дня. Приготовить операционные столы. Простерилизовать помещение операционной ультрафиолетовой лампой в течение 3—4 ч в день операции. Приготовить каждой группе из 4 человек (хирург, сестра, наркотизатор, физиолог) набор материала и заложить его в отдельный бикс для стерилизации: 50—60 шт. ватных тампонов разной величины, 30 марлевых двойных салфеток 30 × 40 см, 4 двойные салфетки с разрезом (40 × 40 см), салфетку марлевою на стол для инструментов и простыню, которой накрывают собаку. Весь этот материал поместить на дно бикса. В последовательности, обратной одеванию, уложить одежду принимающих участие в операции. С самого верха должны лежать халат, шапочка и маска сестры, которая первой моет руки для операции, затем одежда хирурга (его одевает сестра) и затем наркотизатора и физиолога. Стерилизацию провести накануне операции в автоклаве в течение 40 мин при 1,5 атм под контролем старшего лаборанта практикума или преподавателя.

Инструменты (их перечень дан в задаче 1 темы II, следует добавить мозговую ложечку для удаления ткани мозжечка) подобрать также за день до операции, но стерилизовать непосредственно перед операцией. Отдельно простерилизовать шприцы.

За несколько дней до операции студентам каждой группы нужно выбрать собаку, с которой они будут работать, несколько раз вывести ее на прогулку и предупредить обслуживающий персонал вивария о том, чтобы собаку накануне операции не кормили. В день операции собаку взвесить, ввести предварительный наркоз — морфий в наружную поверхность бедра (10 мг/кг массы внутримышечно) и сразу вывести собаку на улицу. Наркотическое состояние начинается во время прогулки (через 20—40 мин после введения), и собаку вносят в предоперационную. Она еще не спит, но предварительный наркоз позволяет спокойно ввести собаке нембутал (20 мг/кг массы внутрибрюшинно), после чего наступает глубокий сон.

В предоперационной с затылочной области головы и с шеи состричь шерсть, протереть кожу спиртом и раствором иода и внести спящую собаку в операционную. Наркотизатору и физиологу уложить животное на операционный стол спиной вверх, привязать лапы к столу, сестре накрыть собаку простыней, а ее голову — салфеткой с разрезом.

После того как все готовы к операции, приступить к выполнению задачи с учетом того конкретного задания, которое получено от преподавателя. В течение всей операции наркотизатор должен поддерживать голову собаки в положении, наиболее удобном для работы хирурга: затылочной костью вверх. Он же должен следить за тем, чтобы язык не западал в гортань и чтобы не было нарушения носового дыхания. Физиологу во время операции каждые 5—10 мин необходимо проверять пульс и частоту дыхания и вносить эти данные в протокол со всеми замечаниями по ведению операции (дополнительное введение

наркотических веществ или других препаратов, величину кровопотери, время отдельных этапов операции).

Операция. Перед тем как сделать кожный разрез, провести местную анестезию 2%-ным раствором новокаина затылочных нервов по гребню и выходов нервов в районе сосцевидных отростков. Разрезать кожу по средней линии на несколько сантиметров выше гребня и вниз до середины шеи. Перевязать крупные сосуды. Рассепаровать затылочные мышцы по средней линии, начиная от гребня, движениями вверх и вбок. При этой сепаровке бывает две ошибки: либо ошибочно сепаруют мышцы выше гребня, либо сепаровку ведут слишком низко на уровне сочленения основания черепа с 1-м позвонком. Сепаровку вести по поверхности затылочной кости, после чего все слои мышц слева и справа от разреза зажать пинцетами Пеана у гребня, как можно ближе к нему. Скальпелем отсечь мышцы от гребня и откинуть их на пинцетах Пеана вниз и в сторону. Кровотечение останавливать горячим раствором Рингера, перекисью водорода, кровавыми тампонами.

Трепанацию проводить в зависимости от конкретной задачи: 1. Полное двустороннее удаление мозжечка. 2. Одностороннее удаление полушария мозжечка. 3. Удаление червя. 4. Подсечка белого вещества и ножек мозжечка. Только для полного удаления мозжечка проводить трепанацию с двух сторон, во всех остальных вариантах использовать одно трепанационное отверстие. Вскрывать череп можно с помощью бормашины. В обоих случаях сохранять выделенный участок кости для заполнения костного дефекта.

Если этот этап операции проведен благополучно, то отчетливо видна пульсирующая твердая мозговая оболочка. Перед ее вскрытием обработать операционную рану: убрать остатки воска, кровавые тампоны, подсушить рану и наложить новые стерильные салфетки. Твердую мозговую оболочку вскрыть следующим образом: прошить ее дважды малой кишечной иглой у нижнего и верхнего краев. Помощнику хирурга подтянуть обе лигатуры, между которыми хирургу сделать разрез глазными ножницами; лигатуры сохранить для последующего сшивания твердой мозговой оболочки. Зарисовать расположение видимых участков мозжечка.

Мозговое вещество удалять поэтапно с помощью мозговой ложечки. Кусочки выбранной мозговой ткани сохранять для оценки объема удаленной части мозжечка. Все движения в непосредственной близости от мозжечка должны быть вверх и вперед с тем, чтобы не повредить дно IV желудочка (продолговатый мозг).

На заключительном этапе: 1) зашить твердую мозговую оболочку; 2) заполнить костный дефект; 3) послойно зашить мышцы непрерывным швом, подшивая их к гребню; 4) присыпать мышцы пенициллином; 5) сшить подкожную клетчатку; 6) прерывистым швом сшить кожу, накладывая вдоль шва валик, смазанный стрептоцидовой мазью.

Выхаживание. Выхаживание животного в ближайшем постоперационном периоде должно быть направлено на предотвращение травм при выходе его из наркоза и первых попытках к вставанию. При продолжительном повышении экстензорного тонуса животное помес-

тить на мягкую подстилку, обеспечить кормление и уход. Не давать собаке наркотические средства, обезболивание следует проводить, вводя внутримышечно анальгин. Для предотвращения септического процесса животным в течение 6—7 дней вводить пенициллин со стрептомицином (первые двое суток каждые 6 ч, последующие сутки — 1 раз). Первые 2—3 дня обеспечить ночные дежурства. Протокол операции заполнить по следующей форме.

Протокол операции

Животное, пол, масса от _____ 19__ г.

Бригада: хирург, наркотизатор, сестра, физиолог

Время	Этапы операции	Пульс	Дыхание

После выхода животного из наркоза дежурный должен занести в протокол появление синдромов мозжечковых расстройств. Первыми проявлениями являются ригидность передних конечностей и опистотонус. Первые попытки встать, как правило, у животного неудачны. Записать наблюдаемые расстройства, определить, к поражению какой сферы они относятся (вестибулярные, спинальные и корковые), за- протоколировать продолжительность тех или иных симптомов. Продолжать наблюдения на протяжении 14—20 дней после операции.

Морфологический контроль. После обсуждения хода работы на конференции с показом опытных собак всей студенческой группы животных забить при глубоком нембуталовом наркозе. Мозг зафиксировать в 10%-ном растворе формалина, сфотографировать его и при необходимости сделать поперечные срезы оставшейся части мозжечка или сагиттальный срез для точной локализации поражений.

До проведения задачи студентам рекомендуется ознакомиться со строением мозга собаки по атласу или препаратам.

Обработка результатов. На основании протоколов наблюдений за животным в послеоперационный период, документальных фотографий поз и двигательных актов описывают перечень мозжечковых расстройств и процесс их компенсации. Охарактеризовывают наблюдаемые расстройства и указывают время их наступления. В послеоперационный период наблюдаются следующие вегетативные и локомоторные нарушения.

Астения — большая утомляемость. Собака, сделав несколько шагов, ложится, появляется одышка, пульс учащается. *Астазия* — собака не может сохранять позу и поддерживать голову. Голова и туловище покачиваются, особенно при произвольных движениях. Наблюдаются маятниковые движения головы, животное не может попасть в кормушку головой. *Атаксия* — собака ходит, закидывая передние лапы («петушиная походка»). Животное не в состоянии передвигать одновременно правую переднюю и левую заднюю, а также левую переднюю и правую заднюю лапы. Обычная «диагональная» походка заменяется новой, при которой собака широко расставляет лапы, вскидывая их вперед гораздо больше, чем это нужно, ударяет ими об пол с большей силой, чем интактное жи-

вотное. Движения становятся несоразмерными (*гиперметрия*) и размахистыми. При перешагивании через препятствие высотой 10 см собака поднимает передние конечности так высоко, как будто преодолевает препятствие высотой 50—70 см.

В некоординированности движений различают статическую и кинетическую атаксию. Следует пронаблюдать их у собак с поражениями в области червя, полушарий и клочков (флоккулус, парафлоккулус). Смена гипертонуса мускулатуры на атонию проходит быстро, поэтому все признаки, связанные с расстройством координированных движений, наблюдают, заставляя животное ежедневно выполнять однотипные движения: вставание, пробежка к кормушке, лакание молока, перепрыгивание через препятствие, ходьба по лестнице. Тремор, качание, промахивание отмечают в протоколе или снимают на киноплёнку. Быстро наступает компенсация функций, и в задачу входит определение ее сроков.

Задача 2. Обратимое выключение мозжечка у крысы

Опыт с обратимым выключением мозжечка проводят на ненаркотизированных и нефиксированных крысах путем охлаждения мозжечка. Преимущества этой методики очевидны: возможность неоднократного повторения эксперимента при прикладывании сухого льда к платиновой фольге, закрывающей мозжечок; возможность наблюдения последствий «холодового выключения», выражающегося в изменении тонуса и координации движений. При этом температура мозжечка изменяется локально. Определено, что при значительном снижении температуры мозжечка температура других мозговых структур не снижается более чем на 1 °C.

Методика. Вживление фольги проводят под нембуталовым (30 мг/кг массы животного) или глубоким эфирным наркозом. Дорсальное и каудальное поверхности червя раскрывают оба полушария мозжечка, не затрагивая твердую мозговую оболочку. Открытые поверхности покрывают листком фольги толщиной 20 мкм. Каудальные и латеральные концы пластинки осторожно задвигают между твердой мозговой оболочкой и костью черепа вокруг открытой области мозжечка, плотно закрепляя фольгу к кости цементфосфатом. Ростральный конец пластинки изгибают так, чтобы получилась камера для охлаждения. Камеру окружают валиком из цементфосфата; она может оставаться в таком положении длительное время (до нескольких недель).

Ход работы. 1. Заложить гранулы сухого льда в камеру для охлаждения (температура субкортикальной ткани на 2—6 мм вглубь от фольги через 4—5 мин после наложения льда падает на 10° C).

2. Отметить симптомы мозжечковых расстройств: атаксия, осцилляторные движения и гипертонус передних конечностей (эти расстройства исчезают, как только температура нервной ткани возвращается к нормальной, что обеспечивается системой кровообращения мозга крысы).

Обработка результатов. На основании фотографий крысы до и после холодового блока описывают мозжечковые расстройства. Представляют схему связей мозжечка с другими мозговыми структурами.

Рекомендуемая литература: [61]; [28]; [51] — с. 133—174; [70].

ТЕМА IX. СТЕРЕОТАКСИЧЕСКИЙ МЕТОД ВВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОДОВ В ПОДКОРКОВЫЕ СТРУКТУРЫ

Стереотаксический метод, обеспечивая неподвижность введенного в мозг электрода, позволяет осуществлять неоднократное раздражение исследуемых структур или отведение их электрической активности в разных условиях эксперимента. Голову животного укрепляют в головодержателе стереотаксического прибора таким образом, чтобы костно-черепные швы, служащие ориентирами, заняли определенное положение. Это обеспечивает нужную ориентацию мозговых структур. Точкой отсчета является средняя точка между ограничителями, накладываемыми на нижние поверхности орбит, благодаря чему осуществляется совмещение плоскостей координатных систем прибора и теоретически проводимых координатных плоскостей в мозге животного (рис. 97, I, II, III). У крысы нулевые координаты определяют по костно-черепным швам. Основная горизонтальная плоскость является и нулевой горизонтальной плоскостью. Эта плоскость проходит через брегму (пересечение сагиттального и коронарного швов) и точку, расположенную на 1 мм выше ламбды (пересечение сагиттального и затылочного швов); она перпендикулярна сагиттальной плоскости.

Стереотаксический метод исследования позволяет регистрировать фоновую электрическую активность любой мозговой структуры. Фоновая ЭГ-активность может меняться в зависимости от физиологического состояния животного, глубины наркоза, состояния сна и бодрствования, вида раздражающих стимулов. При регистрации фоновой ЭГ-активности проявляются морфологические и функциональные различия между отдельными структурами. Так, в переднем гипоталамусе преобладают медленные волны с частотой 3—5 имп/с, а в заднем — низковольтная быстрая активность. В дорсальном гипоталамусе регистрируется низковольтная быстрая активность, а в латеральном — сравнительно медленная активность. ЭГ-активность одного и того же ядра может меняться в зависимости от функционального состояния центральной нервной системы в целом. Если в состоянии бодрствования в вентромедиальном ядре гипоталамуса регист-

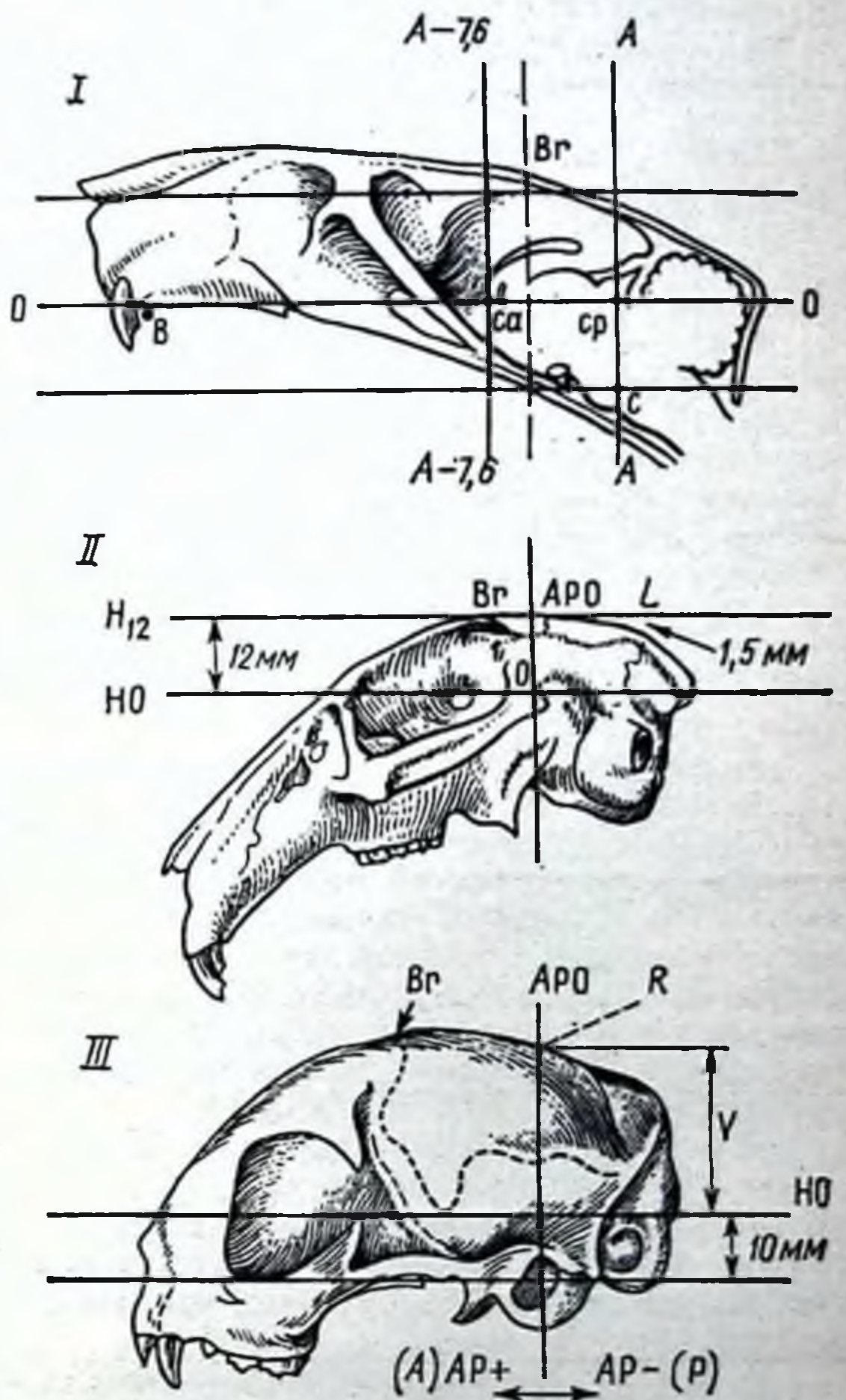


Рис. 97. Основные стереотаксические планы для мозга крысы (I) (по J. de Groot, 1959); кролика (II); (по С. Н. Sawyer et al., 1954) и кошки (III) (по J. Bures et al., 1967):

00 — нулевой горизонтальный план, АА — нулевой фронтальный план, А—7,6 — уровень расположения передней комиссуры са и задней комиссуры ср, с — проекция интераурикулярной линии, Br — брегма, В — держатель верхней челюсти, используемый для установки нулевого горизонтального плана; АРО — нулевая фронтальная плоскость, 0 — центр координат, Н0 — нулевая и Н₁₂ — верхняя горизонтальная плоскости, L — ламбда, R — референтная точка, V — расстояние от R до Н0

рируется ЭГ-активность с частотой 20—35 имп/с и амплитуда ее незначительна, то в условиях легкого нембуталового наркоза частота становится равной 9—15 имп/с.

У бодрствующего находящегося в покое животного фоновая активность гиппокампа характеризуется наличием потенциалов различной частоты: это и частые высоковольтные потенциалы, и ЭГ-активность с частотой 4—7 имп/с. При одно-временной регистрации ЭГ-активности гиппокампа и неокортекса отмечены реципрокные взаимоотношения между ними: в период усиления медленной электрической активности неокортекса в гиппокампе происходит десинхронизация ритмов, и наоборот. Такое взаимоотношение сохраняется во время сна: в неокортексе регистрируется высокоамплитудная синхронизированная активность, в гиппокампе — частые низковольтные потенциалы. При афферентном раздражении в коре возникает отчетливая десинхронизация, а в гиппокампе появляются синхронизированные высокоамплитудные потенциалы правильного регулярного тета-ритма с частотой 4—7 имп/с. При повторных раздражениях постепенно исчезает десинхронизация в коре и тета-ритмическая активность в гиппокампе. Большинство исследователей считают тета-ритмическую активность своеобразным электрографическим выражением гиппокампальной реакции пробуждения, которая обусловлена, как и для неокортекса, восходящим активирующим влиянием РФ. Ряд ученых рассматривают тета-ритмическую активность как один из компонентов ориентировочной реакции.

Фоновая активность миндалевидного комплекса состоит из быстрых и медленных колебаний, амплитуда которых также разнообразна. В миндалевидный комплекс входят ядерные образования, отличающиеся не только по морфологическому строению и связям с другими мозговыми структурами; в них регистрируется неодинаковая ЭГ-активность. При одновременной регистрации ЭГ-активности миндалевидного комплекса и гиппокампа может регистрироваться синхронизированная для этих структур активность с частотой 18—20 имп/с. Но и в этом случае в отдельных ядрах миндалевидного комплекса выявляется свой паттерн ЭЭГ, периодически появляющийся в фоновой активности без каких-либо воздействий.

Миндалевидный комплекс мозга делится на центральное АС, латеральное АЛ, базальное АВ, медиальное АМЕ и кортикальное АСО ядра. И хотя анатомически они тесно связаны друг с другом и образуют единый миндалевидный комплекс, выполняющий определенные функции, для каждого ядра можно выявить свой паттерн ЭГ-активности. Так, в АС чаще всего регистрируется активность, которая не согласуется в ЭГ-активностью других ядер миндалевидного комплекса. Это ядро чувствительно к изменениям условий эксперимента и первым реагирует на применяемый наркоз. На фоне нембуталового наркоза повышается амплитуда медленноволновой активности, при использовании нодистого сукцинилхолина ритм сглаживается.

Для электрической активности АЛ характерна высокая частота, большая амплитуда и синхронизация по ритму с ЭГ-активностью гиппокампа. В активности АВ преобладают низкоамплитудные волны, она независима от ритмов гиппокампа и АЛ, но синхронизируется с активностью гипоталамических структур, что согласуется с морфологическими данными о связях АВ с гипоталамическими структурами.

В медиальном ядре миндалевидного комплекса регистрируются наиболее разнообразные ритмы ЭГ-активности; именно в этом ядре в первую очередь появляются судорожные ритмические разряды, связанные с изменениями электрической активности РФ, таламуса и гипоталамуса, но возникающие и независимо. Эти данные согласуются с представлениями о миндалевидном комплексе как структуре мозга, имеющей низкий порог судорожной активности.

Таким образом, регистрация ЭГ-активности подкорковых структур позволяет выявить их связи с другими мозговыми образованиями, функциональные особенности, чувствительность к различным воздействиям. Стереотаксический метод позволяет ввести электрод в заданную структуру, а последующий, обязательный в таких экспериментах морфологический контроль обеспечивает уверенность в полученных данных.

Определение стереотаксических координат исследуемой структуры мозга проводят по специальным картам, которые представляют собой схемы фронтальных

срезов мозга, изготовленные с учетом его объемных изменений после фиксации (см. рис. 99). Каждая карта имеет свой индекс, показывающий, на каком расстоянии от фронтальной нулевой плоскости сделан срез. *Фронтальной нулевой линией* служит плоскость, проходящая через брегму и перпендикулярная базальной плоскости. Структуры, расположенные роstralнее этой плоскости, обозначаются AP—, каудальнее AP+. Расстояние влево от сагиттальной нулевой плоскости обозначают s, вправо — d. Координаты глубины относительно горизонтальной нулевой плоскости выше ее уровня обозначают V+, ниже — V—. Все расстояния на картах даны в миллиметрах.

Цель работы. Овладеть методикой точного введения электродов в определенные подкорковые структуры мозга крысы в остром и хроническом эксперименте. Зарегистрировать электрическую активность подкорковых структур мозга крысы. С помощью введенных электродов разрушить определенные структуры мозга. Применяя морфологический контроль, определить локализацию кончиков электродов в заданных областях.

Задача 1. Вживление электродов в подкорковые структуры мозга крысы

Методика. Объект исследования — белые крысы массой не менее 200 г. Для выполнения работы необходимо оборудование: стереотаксический прибор конструкции Ю. Н. Беленева (рис. 98); стимулятор; электроды для вживления, состоящие из двух склеенных никелиновых проволочек, покрытых лаковой изоляцией, диаметром 100 мкм и длиной 8—10 мм; набор хирургических инструментов, включающий скальпель, глазные и средние ножницы, глазной пинцет, тонкий зубной бор, а также батарея БАС-100 или БАС-70. Кроме того, необходим цементфосфат (или протакрил) для крепления концов электродов на черепе крысы; эфир для наркоза, перекись водорода, иод, 10%-ный раствор формалина, 30%-ный раствор сахарозы.

Поскольку в конце задачи необходимо провести морфологический контроль, для этого должно быть готово следующее оборудование: микротом, шприц на 10 мл, ампула

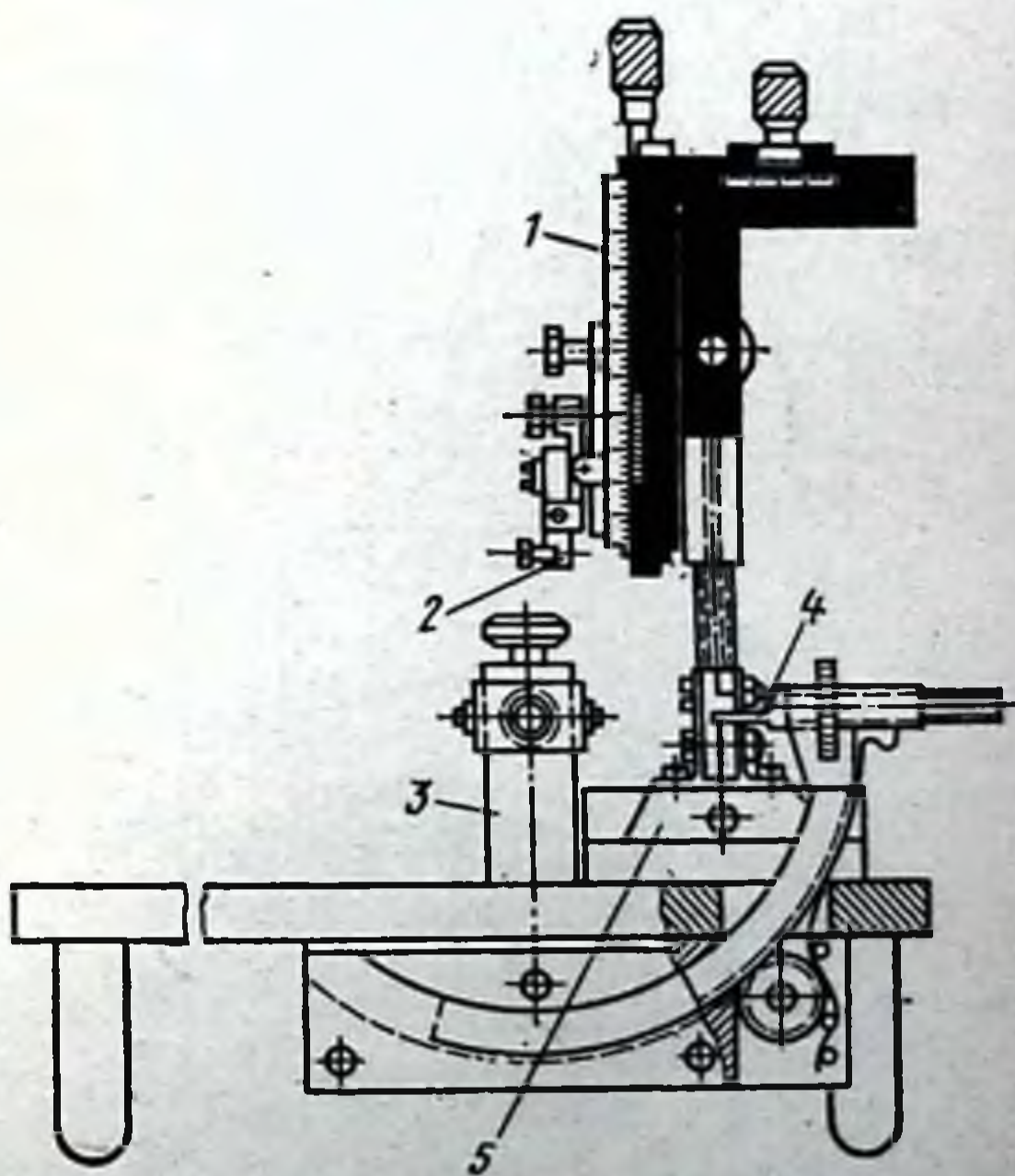


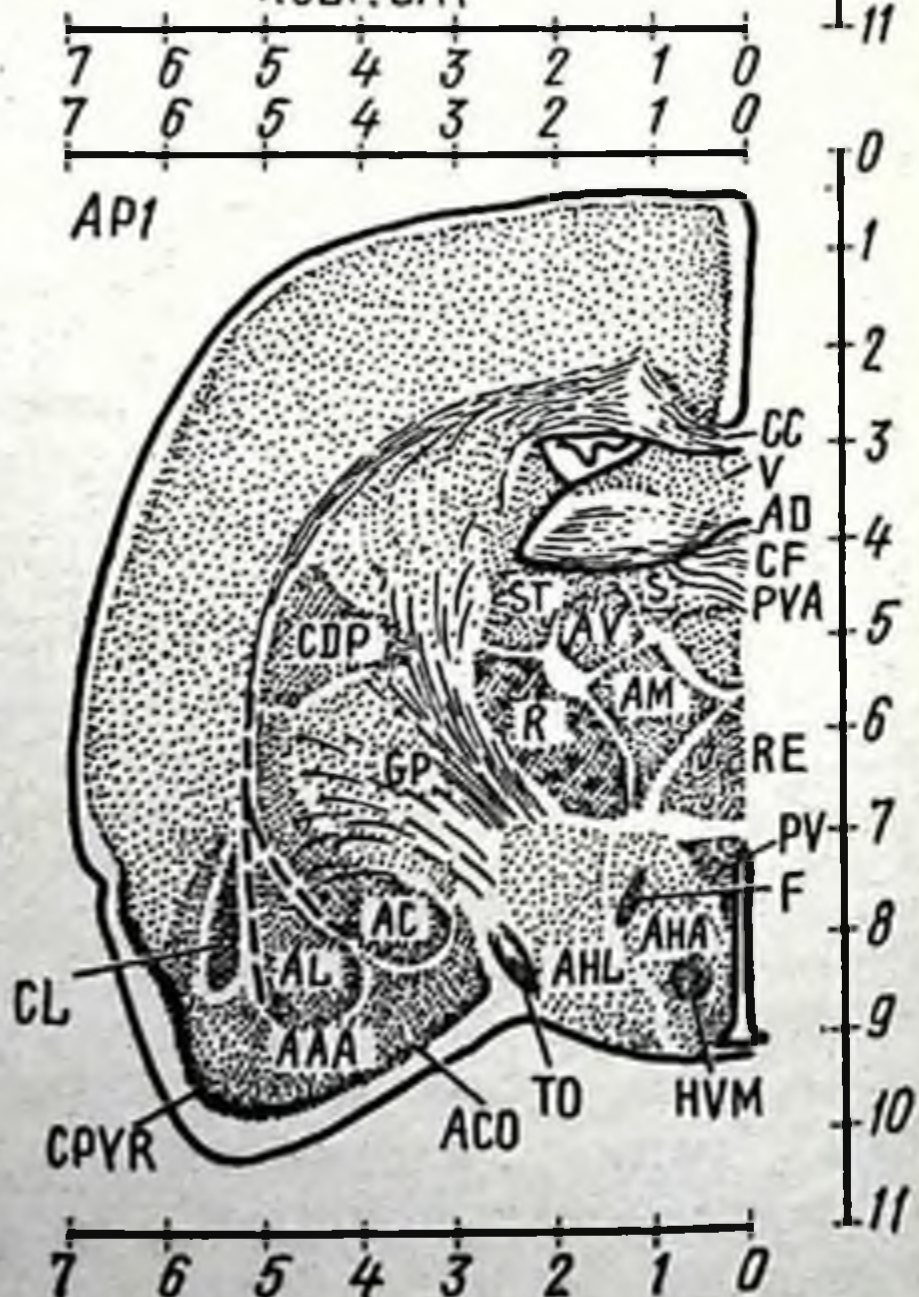
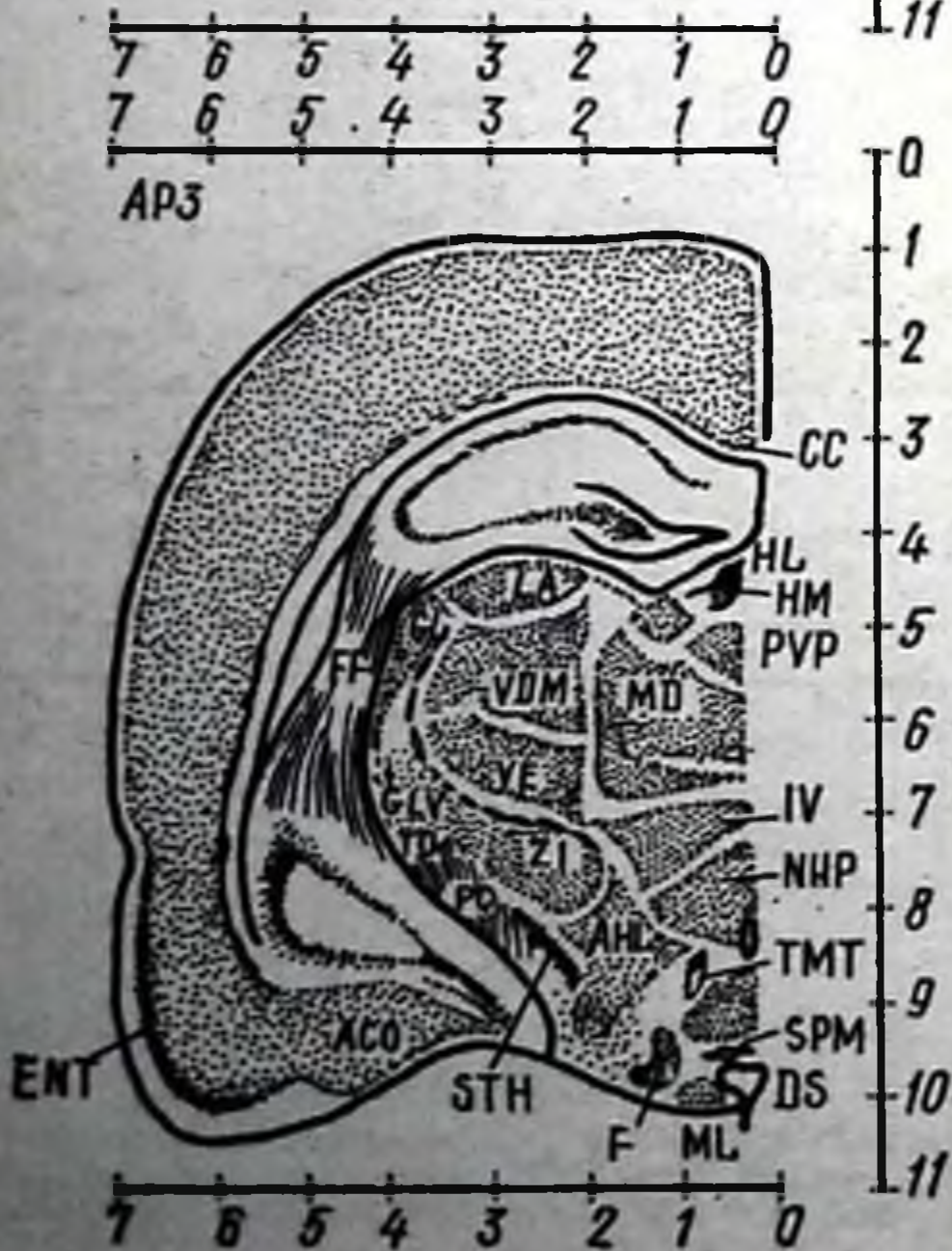
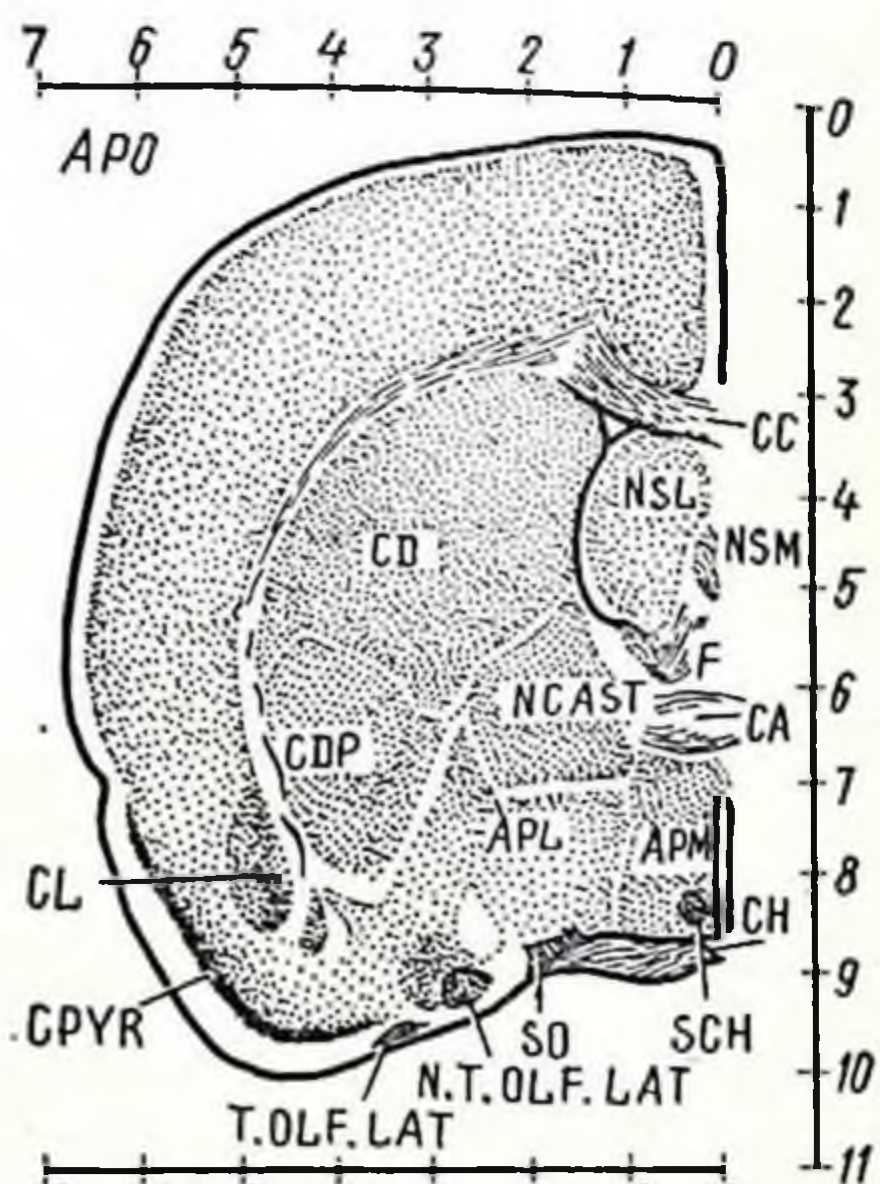
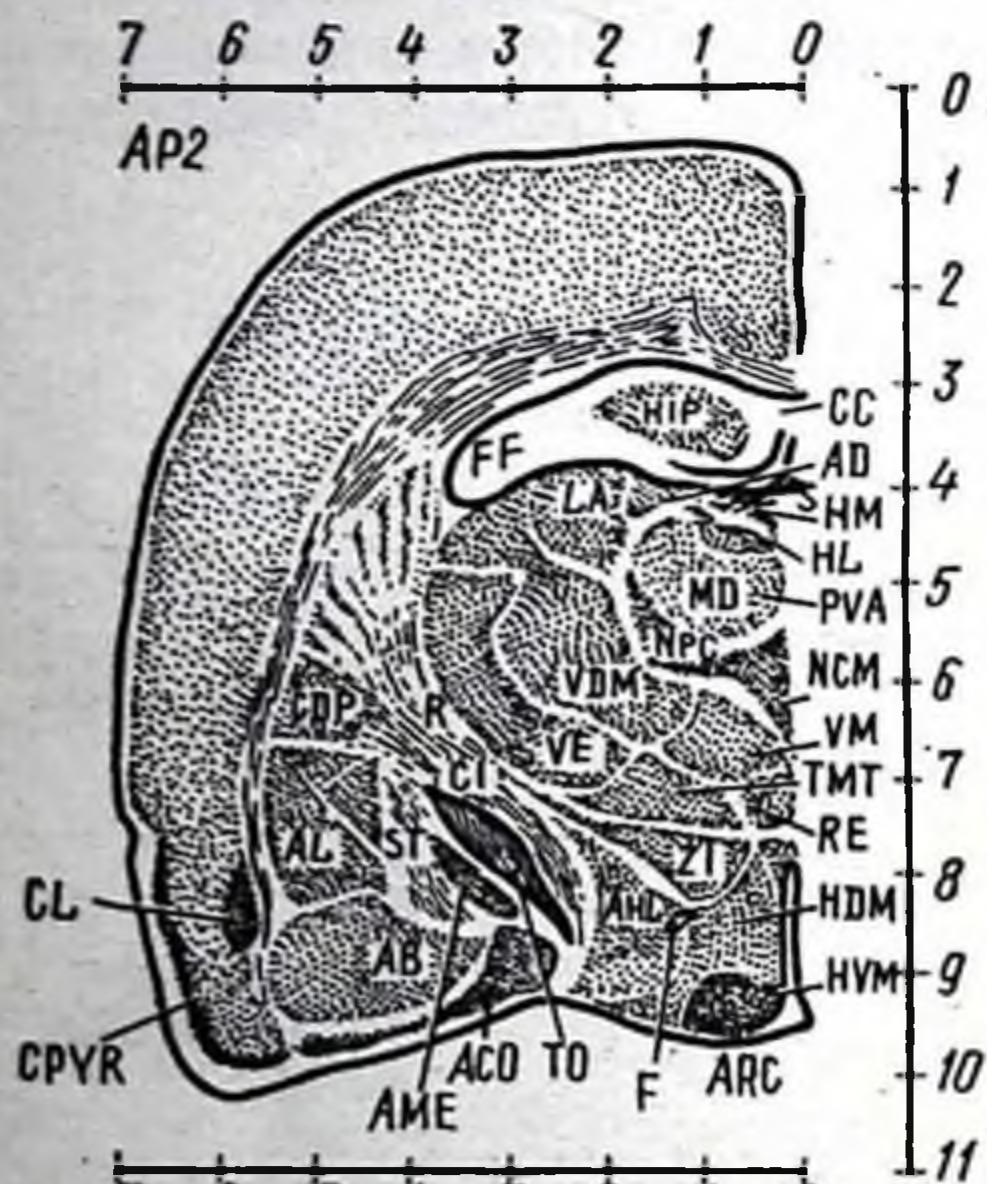
Рис. 98. Стереотаксический прибор Кабака—Беленева для крыс:

1 — препаратоводитель, 2 — держатель электродов, 3 — стойка ушного держателя, 4 — зубной держатель, 5 — механизм поперечного перемещения

хлористого этила для замораживания мозга, предметные стекла, чашки Петри, кисточка для снятия срезов с ножа микротом, фотоувеличитель, реактивы для проявления и закрепления фотоснимков, фотобумага (контрастная).

Ход работы. 1. Поместить крысу под стеклянный колпак, где находится ватный тампон, смоченный эфиром, или ввести ей внутривенно раствор нембутала (30 мг/кг массы).

2. Закрепить голову крысы в стереотаксическом приборе: сначала вставить в ушные раковины ушные держатели так, чтобы положение головы было строго симметричным, затем закрепить верхние резцы в зубном держателе.



3. Привязать задние лапы к ножкам столика стереотаксического прибора марлевыми бинтами.

4. В области предполагаемого разреза кожи на голове выщипать шерсть и скальпелем сделать кожный разрез по средней линии головы в ростро-каудальном направлении.

5. Раздвинуть кожные лоскуты и освободить кость от надкостницы, протирая ее тампоном, смоченным перекисью водорода (перекись водорода останавливает и возможные точечные кровотечения).

6. Черепную кость протереть спиртом или эфиром для подсушивания, при этом более четко проступают швы, необходимые для определения координат, по которым будут введены электроды.

7. Рассчитать координаты заданной структуры мозга, пользуясь картами фронтальных срезов (рис. 99); определить АР, т. е. расстояние от брегмы и расположение структуры каудальнее или ростральнее от нее, а также глубину структуры от относительной горизонтальной нулевой плоскости Н и ее расстояние от сагиттальной плоскости L. Найденные координаты занести в таблицу.

8. Вставить электрод в держатель стереотаксического прибора (см. рис. 98) и, перемещая, установить его таким образом, чтобы его кончик касался брегмы. Затем голову крысы наклонить, с тем чтобы

Рис. 99. Фронтальные срезы мозга крысы:

(n — nucleus)	IV — n. interventralls
AAA — area amygdalaris anterior	LA — n. lateralis anterior
AB — n. basalis amygdalae	MD — n. mediodorsalis
AC — n. centralis amygdalae	ML — n. mammilaris lateralis
AD — n. antero-dorsalis	NCM — n. centralis medialis
AL — n. lateralis amygdalae	NHP — n. hypothalami posterior
AM — n. anteromedialis thalami	NPC — n. paracentralls
AV — n. antero-ventralls	NSL — n. septalis lateralis
ACO — n. corticalis amygdalae	NSM — n. septalis medialis
AHA — area hypothalamica anterior	N. T. OLF. LAT — n. tractus olfactorii lateralis
AHL — area hypothalamica lateralis	PF — n. parafascicularis
AME — n. medialis amygdalae	PC — pedunculus cerebri
APL — area praoptica lateralis	PV — n. paraventricularis
APM — area praoptica medialis	PVA — n. paraventricularis anterior
ARC — n. arcuatus	PVP — n. paraventricularis posterior
CA — comissura anterior	R — n. reticularis
CD — n. caudatus	RE — n. reuniens
CF — comissura fornicis	S — stria medullaris
CI — capsula interna	SO — n. supraopticus
CL — claustrum	ST — stria terminalis
CDP — caudate-putamen complex	SCH — n. suprachiasmaticus
CPYR — cortex pyriformis	SPM — n. supramammilaris
CH — chiasma opticum	STH — n. subthalamicus
DS — decussatio supramammilaris	TMT — tractus mamillo-thalamicus
FF — fimbria fornicis	TO — tractus opticus
GL — corpus geniculatum laterale	T. OLF. LAT. — tractus olfactorius lateralis
GP — globus pallidus	V — ventriculus lateralis
GLV — GL-pars ventralls	VE — n. ventralls thalami
HL — n. habenulae lateralls	VM — n. ventralls medialis
HM — n. habenulae medialis	VDM — n. ventralls pars dorsomedialis
HDM — n. dorsomedialis hypothalami	ZI — zona incerta
HIP — hippocampus	
HVM — n. ventromedialis hypothalami	

брегма оказалась на 1 мм выше ламбды, и определить по шкале препароводителя нулевые координаты брегмы.

9. К нулевым отсчетам, полученным по шкалам препароводителей, прибавить значения координат, найденные при определении положения структуры мозга по картам.

10. Найденную точку, соответствующую местоположению электродов на черепе, промаркировать и сделать бором трепанационное отверстие. Перед введением электрода кость подсушить. После введения электродов на требуемую глубину зафиксировать их с помощью цементфосфата и только после полного его затвердения освободить крысу из стереотаксического прибора.

Морфологический контроль. Задача с использованием стереотаксических приемов исследования считается выполненной, если установлена локализация кончиков введенных электродов. При морфологическом контроле на срезах мозга положение кончиков макроэлектродов определить по очагу, возникающему при пропускании тока через электроды — электролитическое разрушение, или по треку электрода, который найти на серии последовательных срезов. Электролитическое разрушение мозговой структуры наступает в результате пропускания электрического тока через вживленные электроды. Величина области коагуляции зависит от силы и продолжительности тока. В предлагаемой задаче использовать силы тока 20—40 мА, 5 мА и 1 мА, время пропускания тока — соответственно 3—5, 30 с и 1 мин.

После окончания эксперимента перед забором мозга провести его перфузию, обеспечивающую освобождение мозговой ткани от крови и более быструю фиксацию. Перфузию можно проводить под глубоким эфирным или нембуталовым наркозом. Привязать крысу к операционному столу спиной вниз, вскрыть грудную клетку, набрать в шприц 10 мл охлажденного раствора Рингера и ввести инъекционную иглу в левый желудочек сердца. Ввести в сердце 0,5 мл раствора Рингера, после чего вскрыть глазными ножницами ушко правого предсердия. Перфузию проводить до тех пор, пока из предсердия не будет вытекать почти чистый раствор Рингера. Через ту же инъекционную иглу продолжить перфузию, вводя 10%-ный раствор формалина (10—15 мл).

После окончания перфузии отсечь крысе голову, поместить ее в марлевый мешочек вместе с листком бумаги, на котором фиксировать время вживления электродов и исследуемую структуру. Голову крысы вместе с вживленными электродами поместить на 2—3 суток в смесь, состоящую из 10%-ного раствора формалина и 30%-ного раствора сахарозы (1 : 1). Затем мозг освободить из черепа и фиксировать в том же растворе 1—2 суток. Непосредственно перед изготовлением срезов промыть мозг в проточной воде в течение 12—24 ч, отсечь мозжечок и продолговатый мозг и укрепить на столике микротомы, замораживая хлористым этилом.

В работе с ампулой хлористого этила следует соблюдать осторожность, выполняя правила техники безопасности.

Полученные срезы мозга снимать с ножа микротомы кисточкой в

чашку Петри, заполненную водой. Те срезы, на которых виден след электрода или область коагуляции, поместить на предметное стекло и сфотографировать с помощью фотоувеличителя.

Основной ошибкой при выполнении морфологического контроля является несимметричное расположение мозга на столике микротом. Это приводит к тому, что срезы не точно фронтальны, что затрудняет определение структур, в которых заканчивается макроэлектрод.

Поскольку выполнение задачи целесообразно проводить группой по два человека, задание включает работу с четырьмя крысами. Двух животных используют для разрушения одного из ядер таламуса, или ядра миндалевидного комплекса, или хвостатого ядра. Результат электролитического разрушения является единственным доказательством точности попадания электрода в заданную структуру. Двух других крыс готовят для хронического опыта с регистрацией ЭГ-активности подкорковых структур. До выполнения этой части задачи следует сдать предварительный зачет по общим принципам регистрации электрической активности мозга и правилам работы с электроэнцефалографом.

Обработка результатов. При обсуждении результатов указывают возможные причины неточного попадания кончиков электродов в заданные структуры. Рассматривают, какие изменения в мозге могут произойти из-за повреждения системы кровоснабжения ядер при введении электрода и какие ошибки в морфологическом контроле могут быть вызваны сильным электролитическим разрушением.

Задача 2. Регистрация ЭГ-активности подкорковых структур при различных типах наркоза и электрическом раздражении чувствительного нерва

Методика. За сутки до опыта крысе вживляют 3—4 биполярных электрода по методике, описанной в задаче 1, в следующие структуры: теменная кора, дорсальный гиппокамп, базальное или латеральное ядра миндалевидного комплекса, ретикулярное ядро таламуса или ретикулярное ядро моста. Перед началом опыта в условиях эфирного наркоза и местного обезболивания 2%-ным раствором новокаина отпрепаровывают в подколенной ямке задней лапы крысы седалищный нерв.

Для работы необходим 4-канальный электроэнцефалограф, стимулятор типа ЭСЛ-2, экранированная камера, погружные раздражающие электроды.

Ход работы. 1. Записать ЭГ-активность коры и подкорковых структур крысы, находящейся в стереотаксическом приборе в состоянии бодрствования.

2. Поднести к носу крысы колпачок с ватным тампоном, смоченным эфиром, и регистрировать изменения ЭГ-активности по мере углубления наркотического сна.

3. Убрать колпачок с эфиром и наблюдать изменения ЭГ-активности по мере выхода животного из наркоза.

4. Ввести внутривенно раствор нембутала (30 мг/кг массы) и регистрировать наступление глубокого наркотического сна.

5. Подвести электроды под седалищный нерв и, подавая раздражение, наблюдать изменения ЭГ-активности. Параметры раздражающего тока: частота 100 имп/с, длительность 1 мс, силу тока подбирают в ходе опыта.

Обработка результатов. Анализируют подлинные энцефалограммы, зарегистрированные при разных типах наркоза и в состоянии бодрствования животного.

Задача 3. Регистрация эпилептиформной активности в миндалевидном комплексе мозга крысы при ритмическом электрическом раздражении

Методика. С целью регистрации судорожной активности в ядрах миндалевидного комплекса, вызванной их электрической стимуляцией, за сутки до опыта в левую и правую миндалины вводят биполярные нихромовые электроды (см. задачу 1). Опыт проводят без наркоза, поместив крысу в специальную камеру, где животное находится в условиях свободного поведения. Показателем наступления судорожной активности служат распространяющиеся разряды последствия, появляющиеся в ЭГ-активности.

Ход работы. 1. Поместить крысу в камеру и соединить регистрирующие электроды (одновременно они служат для стимуляции) с проводами от распределительного блока, позволяющего переключать электроды с регистрации на стимуляцию.

2. Регистрировать фоновую активность обеих миндалин.

3. Переключить электроды на стимуляцию и раздражать миндалину одного полушария силой тока не более 50 мкА, частотой 60 имп/с, длительностью 0,5 мс.

4. Переключить электроды на регистрацию и записать ЭГ-активность.

5. Увеличивать силу раздражения ступенями по 50 мкА, регистрируя после очередной стимуляции ЭГ-активность. Отметить силу тока, при которой в ЭГ-активности зарегистрированы распространяющиеся разряды последствия (РПД).

6. Задача может быть усложнена, если электроды заблаговременно введены не только в миндалину, но и другие мозговые структуры (гиппокамп, лимбические структуры, неокортекс). В этом случае при повышении силы раздражения можно зарегистрировать распространение РПД в другие структуры.

Обработка результатов. Представляют ряд записей ЭГ-активности миндалины и других структур мозга с указанием силы раздражающего тока и данные морфологического контроля с локализацией кончиков электродов.

Рекомендуемая литература: [13] — с. 290—299, 384—386; [36] — с. 164—185, 243—245; [30] — с. 224—236; [64] — с. 152.

ТЕМА X. ХРОНИЧЕСКАЯ ИЗОЛЯЦИЯ МЕДНОБАЗАЛЬНОГО ГИПОТАЛАМУСА (ПО Б. ХОЛАСУ)¹

Меднобазальная часть гипоталамуса (МБГ) играет важнейшую роль в контроле гипофизарной секреции. Область МБГ простирается латерально на 0,5—1 мм от средней линии и включает в себя аркуатное ядро, вентральную часть перивентрикулярного ядра, медиальную часть ретрохиазматической области и медиальную эмпиенцию (рис. 100). Только МБГ способен поддерживать нор-

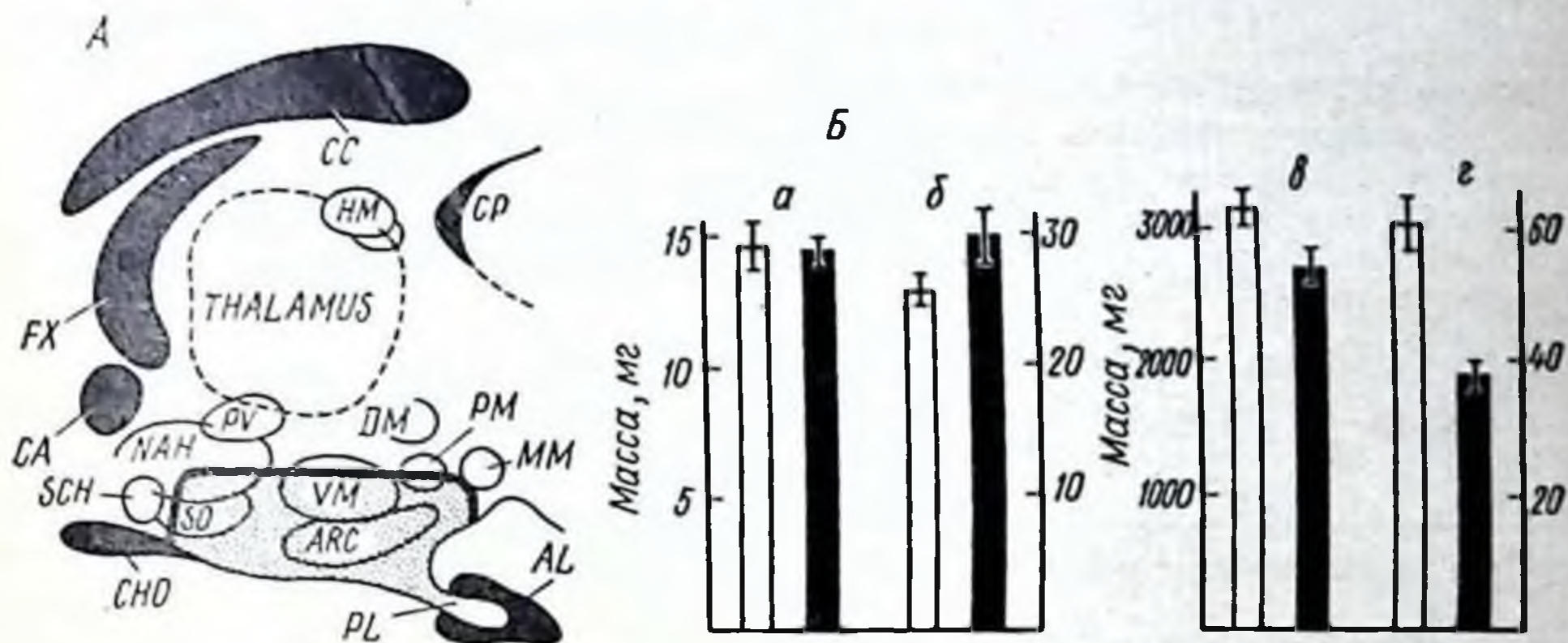


Рис. 100. Деафферентация меднобазального гипоталамуса у крысы (по В. Nalász, 1975). А — сагиттальный срез мозга с ядрами, попадающими после операции в деафферентированную область (ниже жирной линии показаны точки); Б — эндокринные изменения после операции:

а — щитовидная железа, б — надпочечники, в — семенники, г — яичники; белыми столбиками показана масса у контрольных животных, черными — у опытных; AL — передняя доля гипофиза, ARC — аркуатное ядро, CA — передняя комиссура, CC — мозолистое тело, CHO — хиазма, CP — задняя комиссура, DM — дорсомедиальное ядро, FX — свод, HM — медиальное ядро уздечки, MM — медиальное мамиллярное тело, NAH — переднее гипоталамическое ядро, PL — задняя доля гипофиза, PM — переднемамиллярное ядро, PV — паравентрикулярное ядро, SCH — супрахиазматическое ядро, SO — супраоптическое ядро, VM — вентромедиальное ядро

мальную секрецию и структуру пересаженного переднего гипофиза, и именно в этой области гипоталамуса секретируются многие либерины. Для выяснения, является ли эта область только передатчиком влияний со стороны других мозговых структур к аденогипофизу или она оказывает регулярное влияние на гипофиз сама, была предложена модель гипоталамического островка: область МБГ оказывалась не связанной синаптически с вышележащими мозговыми структурами, но все связи ее с гипофизом сохранялись и она подвергалась гормональному влиянию по механизму обратной связи.

МБГ является автономной системой, он играет ключевую роль в контроле за ритмическими процессами, происходящими в аденогипофизе; через МБГ к гипофизу передаются влияния лимбической системы и неокортекса. У животных с изолированным МБГ блокируется овуляция, увеличивается базальная секреция АКТГ, нарушается суточный ритм АКТГ, частично уменьшается базальная секреция тиреотропного гормона. Следовательно, эти гипофизарные функции, нарушающиеся после изоляции МБГ, поддерживаются вторым уровнем регуляции по Б. Холасу.

Таким образом, область МБГ является не только конечным звеном в гипоталамическом контроле переднего гипофиза, преобразующей и передающей влияния других мозговых структур на аденогипофиз, но представляет собой особый

¹ В разработке задачи на практикуме принимала участие канд. биол. наук Р. Д. Платонова.

уровень в гипоталамическом контроле, так как структура гипофиза и базальная секреция тропных гормонов поддерживаются в значительной степени самим МБГ. Функциональное состояние МБГ зависит от обратных влияний со стороны гормонов, циркулирующих в крови: после нервной изоляции МБГ односторонняя адреналэктомия сопровождается гипертрофией оставшегося надпочечника. Введение эстрогенов, андрогенов и кортикостероидов в МБГ вызывает значительное понижение секреции гипофизарных тропных гормонов. Но функции только этой области гипоталамуса недостаточно, чтобы поддерживать гормональную секрецию аденогипофиза на нормальном уровне.

Изучение функций МБГ после его деафферентации интересно в нейрофизиологическом плане: клетки ядер, входящих в МБГ, развиваются без экстрагипоталамических нервных влияний, а под управлением только афферентных межъядерных связей и обратных гормональных влияний. Этим, видимо, объясняется изменение эмоциональной реактивности таких животных. После операции изменяется поведение животных: реакция избегания открытого поля, условно-рефлекторное избегание и реакция в ответ на болевое электрическое раздражение другой особи.

Цель работы. Освоить методику стереотаксического введения ножа и принцип пересечения внутримозговых связей в области переднего и заднего гипоталамуса. Провести операцию полного нарушения нервных связей медиобазальной части гипоталамуса. Пронаблюдать за ростом и развитием крыс после деафферентации медиобазальной части гипоталамуса.

З а д а ч а. Стереотаксическая операция по деафферентации медиобазального гипоталамуса у крысы

Методика. Предварительно изготавливают нож для проведения операции из стальной проволоки диаметром 0,5 мм. Проволоку затачивают, чтобы получить конец в форме двухреберного ножа. Ребра должны быть одинаковой длины, что контролируют в процессе изготовления с помощью микроскопа. Длина ребер ножа равна 2 мм. После получения одинаково острых поверхностей на конце проволоки ее помещают в длинную стальную трубку (можно использовать инъекционную иглу 19-го калибра). Нож должен выступать с одного конца трубки, а с другого конца проволоку загибают в форме ручки. Она определяет угловую позицию ножа и положение его при фиксации в вертикальном направлении. В том случае, когда студент получает готовый нож, он должен проверить его острие под микроскопом и убедиться, что на краях нет зазубрин и грани одинаковые.

Для эксперимента берут крыс массой 60—80 г. Используют стереотаксический прибор Кабака—Беленева (см. рис. 98).

Ход работы. 1. Ввести внутривенно крысе раствор нембутала в дозе 30 мг/кг массы (следует точно рассчитать навеску, иначе животное не сможет выйти из наркотического состояния).

2. Поместить животное в стереотаксический прибор так, чтобы плоскость фиксации головы составляла с плоскостью горизонтального движения электрододержателя угол в 10° . Такое крепление головы крысы обеспечивает возможность расположения вентральной поверхности гипоталамуса в горизонтальной плоскости, что при непрерывном движении электрододержателя вперед и назад предотвращает изменение вертикальных координат.

3. Разрезать кожу на голове, зачистить черепную кость перекисью водорода и определить на черепе точку, которую необходимо просверлить для введения ножа. Эта точка располагается позади брегмы по средней межполушарной фиссуре.

4. Просверлить череп и ввести нож, непрерывно опуская его через третий желудочек к вентральной поверхности гипоталамуса. (При этой операции повреждается сагиттальный синус и наблюдается обильное кровотечение. Необходимо дождаться его остановки, применяя гемостатическую губку, и только после этого продолжить выполнение эксперимента. В противном случае животное может погибнуть в результате образования больших внутримозговых гематом.)

5. Начальной точкой отсчета является точка, лежащая на 6 мм вперед от плоскости удержателя. Нож опустить до касания его с основанием черепа, затем незначительно поднять вверх и с помощью ручки повернуть на 90° вправо, затем влево. В крайней правой позиции нож опустить ниже на 0,2 мм и передвинуть его назад на 2,5 мм. Затем нож поднять на 0,5 мм и повернуть на 180° , отсекая область гипоталамуса в форме полукруга. Все манипуляции необходимо повторить в обратной последовательности.

Выхаживание животных. Наиболее частым осложнением является потеря зрения животным и быстро развивающееся ухудшение состояния: вялость, отказ от пищи, агрессивность. Это связано с неточностью проведения деафферентации и с повреждением зрительного нерва.

После окончания операции животное помещают в отдельную клетку на первые 2—3 суток послеоперационного периода и тщательно наблюдают за его состоянием, при необходимости применяя такие средства, как кордиамин, лобелин, пенициллин и глюкозу. Затем их помещают в общую клетку и наблюдают за ростом и развитием.

Спустя 4—6 недель проводят морфологический контроль по указанной выше методике (задача 1 темы IX). Наряду с фронтальными срезами мозга в данной задаче можно сделать и парасагиттальные срезы. В этом случае, как показано на рис. 100, Д, четко определяется граница пересечения между гипоталамусом и таламусом в rostrocaudальном направлении.

Обработка результатов. Основной целью задачи является овладение методом хронической деафферентации МБГ, но в процессе выхаживания животных можно наблюдать изменения в их поведении и эмоциональной реактивности.

Рекомендуемая литература: [2]; [44] — с. 216; [68] — с. 149—162; [63]; [3] — с. 104—121.

ТЕМА XI. РЕАКЦИЯ САМОРАЗДРАЖЕНИЯ У КРЫСЫ И КРОЛИКА

Феномен самораздражения впервые был показан Дж. Олдсом и П. Милнером на крысах с электродами, вживленными в септум и в область вблизи передней комиссуры. Крысу помещали в камеру, и ей предоставлялась возможность, нажимая на педаль, наносить себе раздражения. Стимул прерывался каждые 0,5 с, поэтому крыса для нанесения нового раздражения должна была отпустить педаль и снова ее нажать. Частота нажатия на педаль может служить количественным показателем интенсивности реакции животного.

Вопрос о локализации в мозгу точек, из которых могут быть вызваны реакции самораздражения, стал важнейшим в нейрофизиологических исследованиях. Эффект самораздражения получают у животных с электродами, помещенными в поясную извилину, мамилло-таламический тракт, септум, медиальный переднемозговой пучок. Самораздражение является несомненно *положительным подкреплением* и связано со стимуляцией лимбических структур мозга. Существенно отличаются эффекты, получаемые из медиальной и латеральной областей гипоталамуса.

В мозге обнаружены также точки, раздражение которых вызывает противоположно направленную реакцию — *избегание*. После однократного замыкания цепи животное не подходит к педали. Реакции самораздражения и избегания — сложные поведенческие акты. Интенсивность их зависит от физиологического состояния животного: если электроды вживлены в центры гипоталамуса, связанные с организацией пищевого и питьевого поведения, то интенсивность реакции зависит от степени голода и жажды.

Электрические раздражения определенных точек лимбической системы вызывают возбуждение лимбических кругов и всей сложной структуры корково-подкорковых путей, которые необходимы для организации целенаправленного поведения. Повреждение связей, разрушение ядер лимбической системы отражаются на эффектах самораздражения. Меняется эффект самораздражения и в зависимости от силы раздражающего тока: усиление тока приводит к улучшению реакции самораздражения и повышению частоты тета-ритмической активности. При большой интенсивности раздражения реакция самораздражения сопровождается высокочастотной электрической активностью мозга.

Реакция самораздражения является удобным тестом для изучения действия фармакологических препаратов и психотропных средств. Такие транквилизаторы, как хлорпромазин и резерпин, резко подавляют реакцию самораздражения; малые дозы барбитуратов и амфетамин могут повышать частоту реакции. Фармакологический подход к изучению реакции самораздражения показал, что, видимо, холинергическая система мозга играет менее важную роль в осуществлении этой реакции, чем адренергическая. Однако механизмы реакции самораздражения до конца не выяснены. Существует несомненная связь между реакцией самораздражения и удовлетворением естественных потребностей. Так, через электроды, вызывающие самораздражение, можно вызвать акты еды, питья, половую реакцию. Отчетливо показано, что топографически центры биологических потребностей (голод, жажда, половое влечение) не совпадают с обширными зонами, раздражение которых вызывает эмоциональные реакции удовольствия или отвращения (рис. 101). Следовательно, необходима крайняя осторожность при оценке самораздражения с точки зрения физиологии эмоций.

Реакцию самораздражения у кроликов получали при расположении электродов в разных точках медиального переднемозгового пучка и в латеральном гипоталамусе (рис. 102). Менее регулярно реакцию получали из латерального преоптического ядра, перегородки, интерпедункулярных ядер. Раздражение вентро- и дорсомедиальных, пара- и перивентрикулярных, задних и дорсальных ядер гипоталамуса, а также ядер таламуса и РФ крыши среднего мозга вызывает отрицательные реакции.

В отличие от крыс кролики плохо учатся нажатию на педаль, поэтому у них вырабатывают инструментальный навык схватывания рычага, на котором лежит морковь, зубами, что приводит к замыканию электрической цепи. Через некоторое время кролик осуществляет реакцию самораздражения, дергая за рычаг, на котором нет моркови.

Цель работы. Освоить приемы обучения крысы реакции самораздражения при хронически вживленных электродах в области положительного подкрепления (латеральный гипоталамус или септум). Освоить приемы стереотаксического введения биполярных тестирующих электродов в области положительного подкрепления (латеральный гипоталамус) у кролика. Освоить приемы обучения кролика реакции самораздражения при хроническом вживлении электродов в области положительного подкрепления.

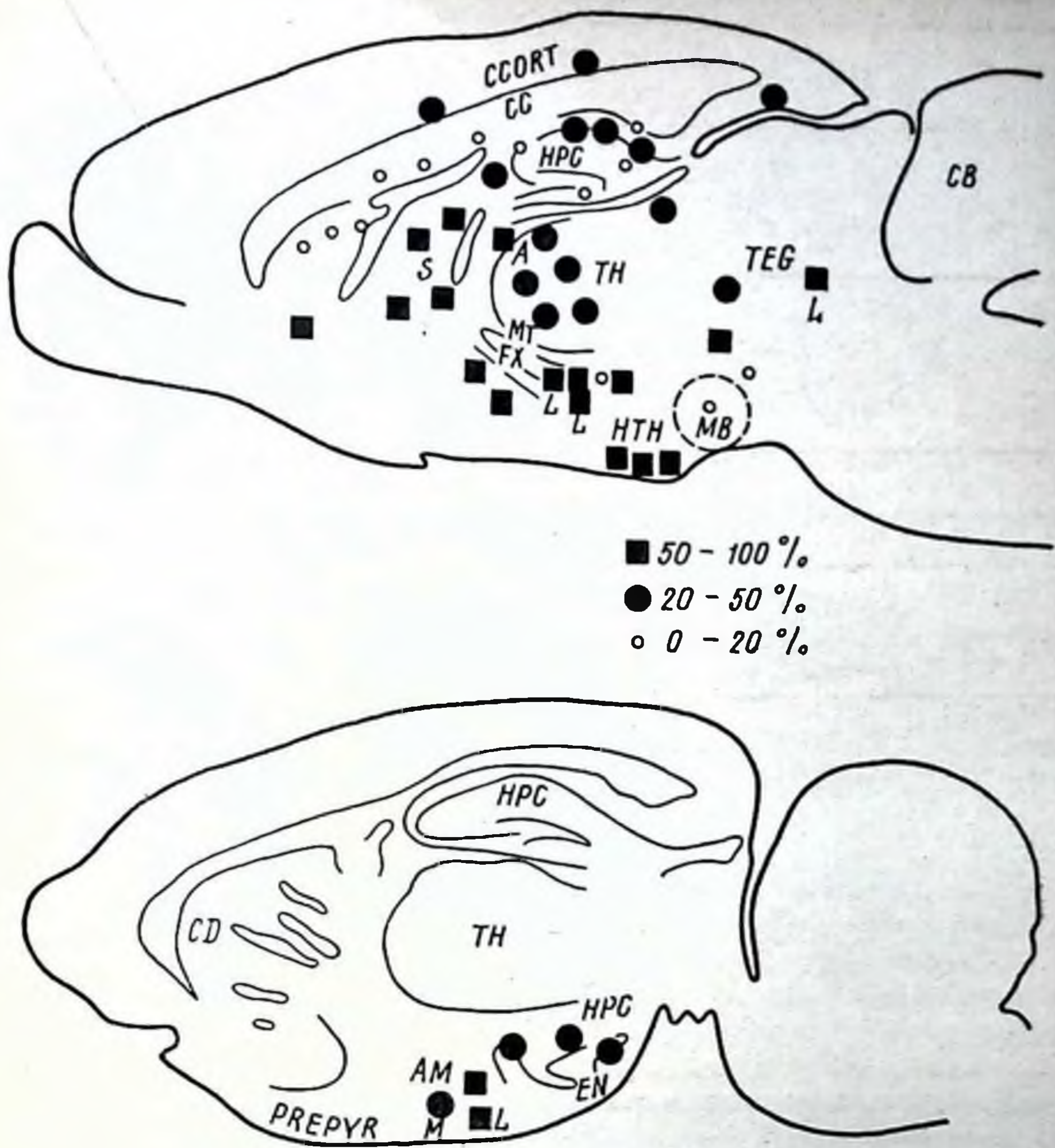


Рис. 101. Локализация центров положительного подкрепления в опытах с самораздражением у крыс (по Дж. Олдсу, 1961; К. Прибраму, 1975):

А — передний таламус, АМ — амигдала, CD — хвостатое ядро, СВ — мозжечок, CCORT — поясная извилина, EN — энторинальная кора, Fx — свод, HPG — гиппокамп, HTH — гипоталамус, MB — мамиллярное тело, MT — мамиллоталамический тракт, PREPYR — препириформная кора, S — перегородка, TEG — тегментум, TH — таламус

Задача 1. Реакция самораздражения у крысы

Методика. В опыт берут самцов крыс массой 200—250 г. Электроды вводят по правилам, изложенным в методике задачи 1 темы X, в одну из следующих структур: септум, латеральный гипоталамус при $AP = 0$, $AP = +2$, $AP = +3$. Для определения координат заданных структур используют карты рис. 99 или более подробные карты из книги Я. Буреша и др. (1962), а также схему Дж. Олдса (см. рис. 101) с расположением центров положительного подкрепления на сагиттальных срезах мозга крысы.

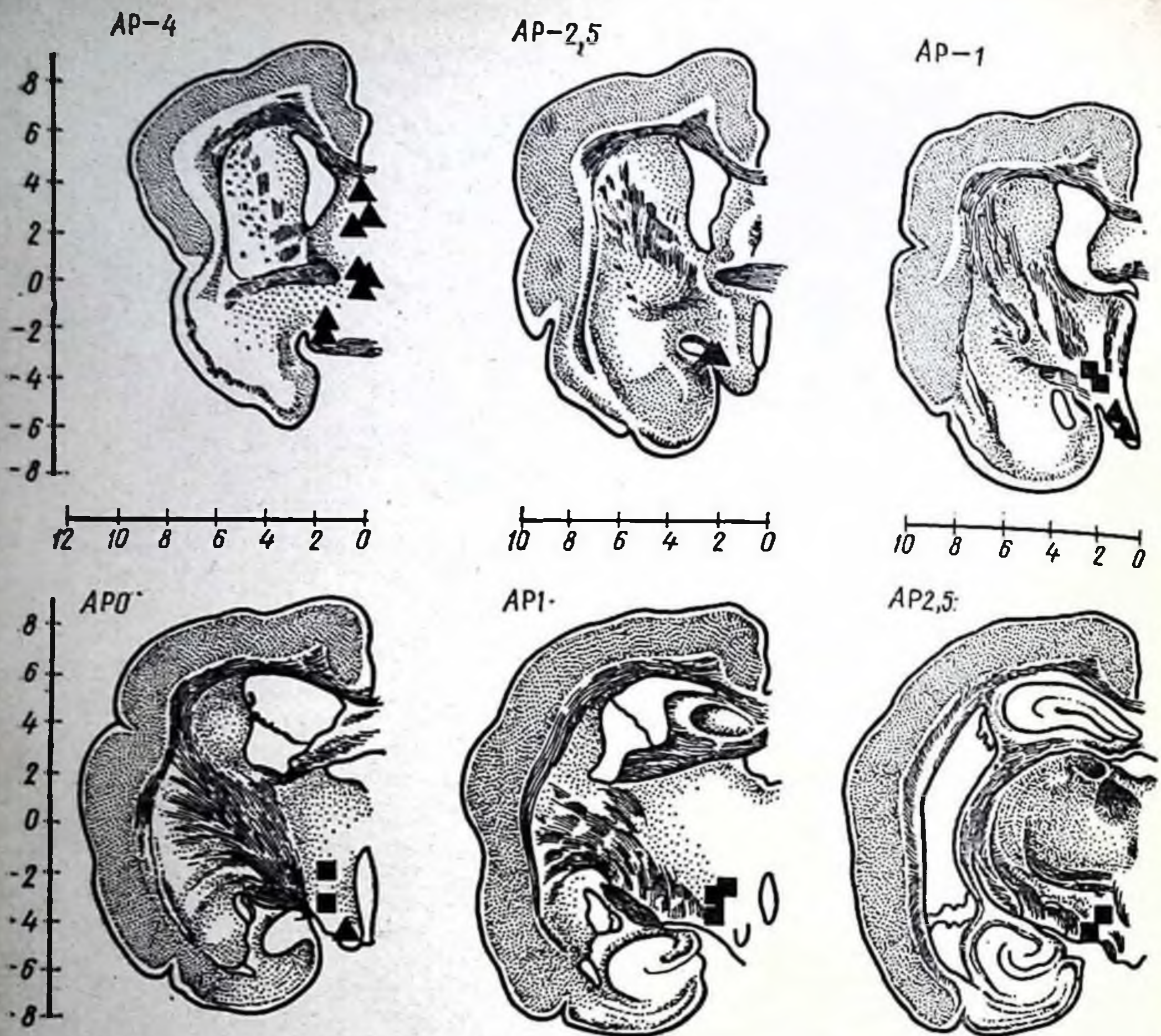


Рис. 102. Фронтальные срезы мозга кролика с локализацией участков, раздражение которых вызывает определенный тип эмоциональной реакции. Квадратами обозначены положительно подкрепляемые зоны, треугольниками — отрицательно подкрепляемые зоны (по В. П. Белому, С. А. Чепурнову, 1973)

Для выполнения задачи необходима камера для самораздражения с рычагом; самописец Н-103 со скоростью движения бумажной ленты 4 мм, стимулятор.

Ход работы. 1. На следующий день после вживления электродов поместить крысу в камеру с педалью, подключить провода от стимулятора к вживленным электродам и замкнуть ток в тот момент, когда крыса подойдет к педали. Такое «научение» повторить несколько раз: каждый раз, когда крыса в процессе ориентировочной деятельности подходит к педали. При правильном положении электродов «научение» не занимает более 5—10 мин.

2. Каждое замыкание тока вызывает у крысы реакцию поиска, и с определенного момента она начинает нажимать на педаль систематически. В это время включить самописец и записать сигналы, возникающие при замыкании электрической цепи при нажатии на педаль.

Обработка результатов. Частота нажатия на педаль характеризует интенсивность реакции самораздражения. Подсчитав число зубцов, строят график, характеризующий реакцию самораздражения испытуемого животного: по оси абсцисс откладывают время, по оси ординат — число нажатий на педаль за каждые 5 или 10 мин. При обсуждении результатов обращают внимание на следующие вопросы: чем объясняется изменение реакции самораздражения при отключении коры, при удалении лобных долей, при разрушении внутрилимбических связей; как влияет на формирование реакции самораздражения ориентировочная деятельность; чем можно объяснить быстрое угасание эффекта самораздражения при выключении тока?

З а д а ч а 2. Реакция самораздражения у кролика

Методика. В опыт берут самцов кроликов массой 2,5—3 кг и помещают их в стереотаксический прибор. Череп кролика укрепляют в головодержателе таким образом, чтобы брегма находилась на 1,5 мм выше ламбды (см. рис. 97). Плоскость, проходящая через брегму и воображаемую точку, расположенную на 1,5 мм выше ламбды, соответствует основной горизонтальной плоскости. Параллельная ей плоскость, проходящая на 12 мм ниже, служит горизонтальной нулевой плоскостью. Координаты структур, расположенные выше этой плоскости, обозначаются $V+$, ниже $V-$. Проходящая через брегму плоскость, перпендикулярная базальной плоскости, служит фронтальной нулевой плоскостью. Структуры, расположенные роstralнее этой плоскости, обозначают $AP-$, а каудальнее $AP+$. Расстояние от сагиттальной нулевой плоскости влево обозначается буквой s , вправо — d .

В черепе кролика просверливают отверстия над латеральным гипоталамусом ANL в соответствии с координатами, рассчитанными по атласу (Буреш, и др., 1962), или по рис. 103 и рис. 104 ($AP = +1$, $V = 2$). В отверстие опускают инъекционную направляющую иглу до верхней границы исследуемой структуры. Через иглу пропускают биполярные электроды, которые ступенями погружают в ядро гипоталамуса, каждый раз применяя серию коротких раздражений с частотой 100 имп/с, длительностью импульса 0,5 мс и продолжительностью 0,5—1 с. Тестирующие раздражения должны вызывать пищевую реакцию на морковь, находящуюся в поле зрения кролика и доступную для схватывания. В найденном положении электрод вместе с направляющей иглой фиксируют на черепе с помощью висфатцемента.

Опыт с выработкой реакции самораздражения проводят через 1—2 суток после вживления электродов. Камера для выработки реакции самораздражения представляет собой ящик с зарешеченными стенками $1 \times 1 \times 1$ м³, с рычагом для нажатия на высоте 20 см от пола в одном из углов камеры. В первые дни кролика приучают схватывать рычаг зубами, вкладывая в него кусочек моркови; в этот момент замыкается контакт и включается электрическая цепь раздражения. Если при этом активизируется система положительного подкрепления, то вскоре вырабатывается реакция самораздражения.

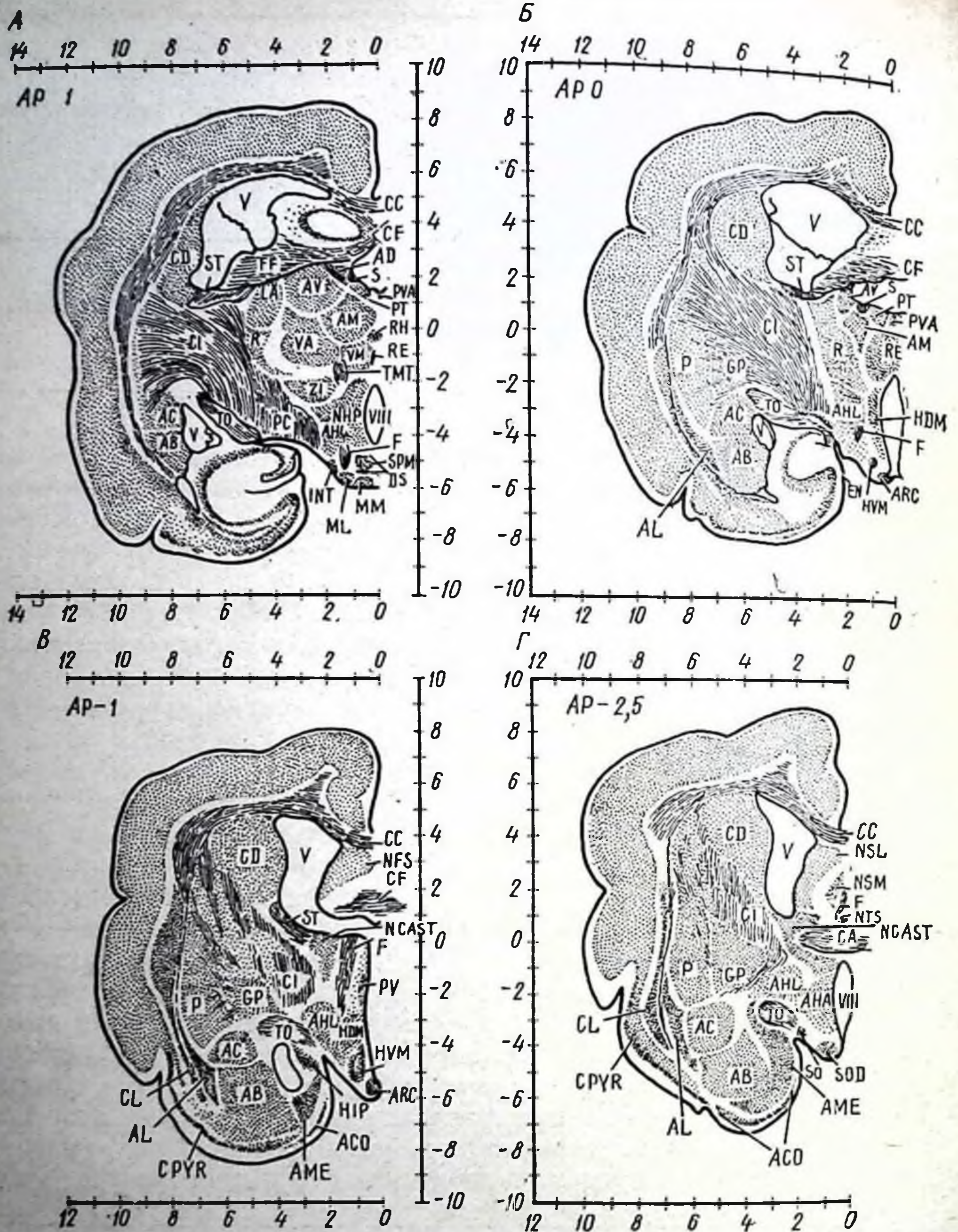


Рис. 103. Фронтальные срезы мозга кролика (А, Б, В, Г) (обозначения см. на рис. 99)

Ход работы. 1. Кролика, приученного нажимать на рычаг, поместить в камеру и, подбирая оптимальную силу раздражающего тока в пределах 2—5 В, наблюдать выработку реакции самораздражения.

2. Определить визуально частоту реакции самораздражения, подсчитывая число нажатий на рычаг за каждые 10 мин. Оптимальной считается частота 25—35 в минуту.

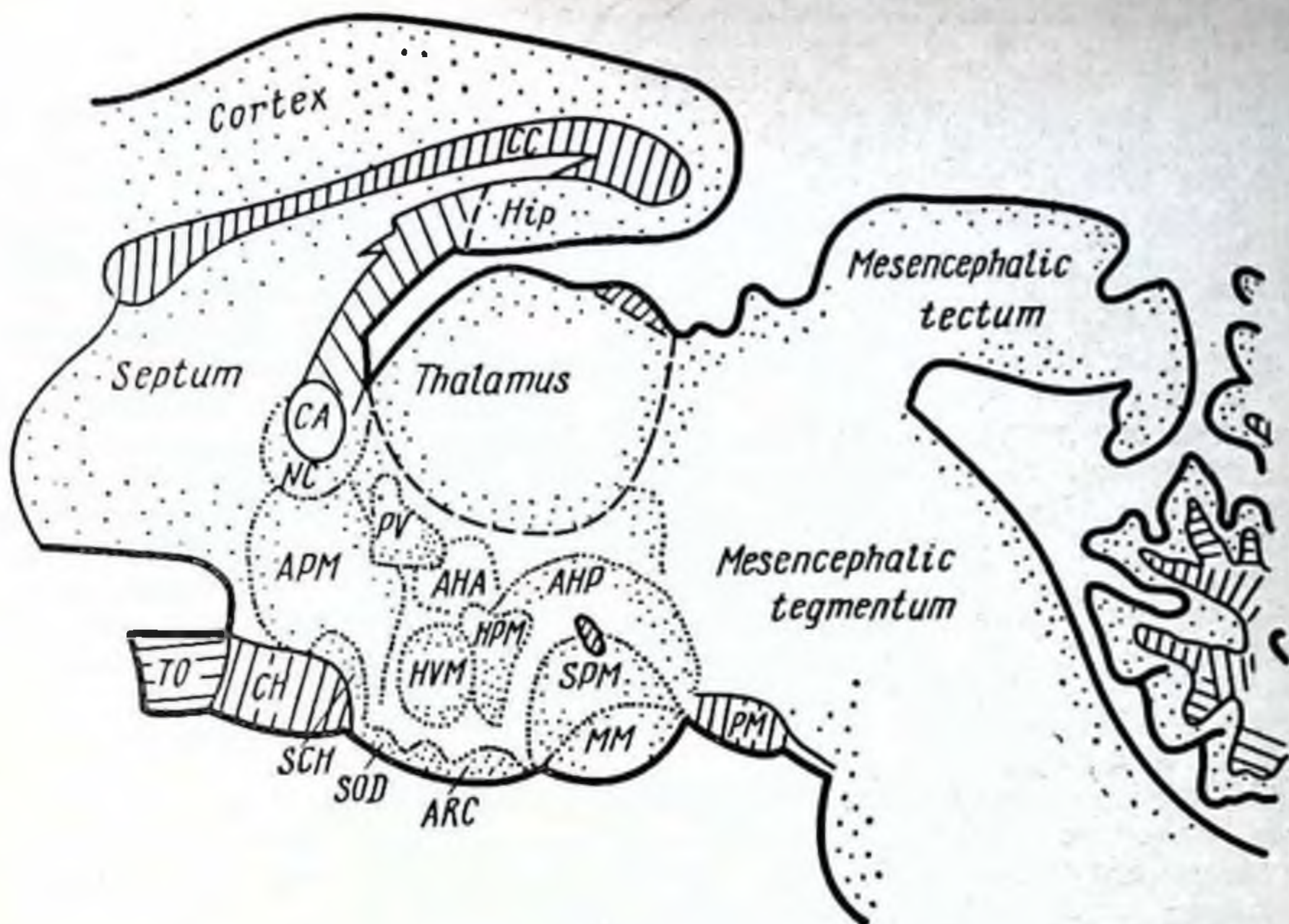


Рис. 104. Ядра гипоталамуса кролика на сагиттальном срезе мозга (по И. П. Цветковой, 1978)

3. Провести после окончания эксперимента морфологический контроль положения кончика электрода по методу, изложенному в задаче I темы X.

Обработка результатов. По результатам визуального наблюдения строят график изменения частоты самораздражения во времени. По оси абсцисс откладывают время, по оси ординат — число нажатий на рычаг за 10 мин.

Рекомендуемая литература: [55] — с. 304; [52]; [16] — с. 134; [68] — с. 181—196; [65] — с. 92.

ТЕМА XII. ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММА ЧЕЛОВЕКА

Развитие электроэнцефалографии шло параллельно с усовершенствованием методов отведения ЭЭГ от черепа и с развитием электронной техники, применяемой для регистрации активности мозга.

В последние годы электроэнцефалография в связи с практической и теоретической ценностью получаемых данных стала одним из ведущих и быстро развивающихся отделов физиологии. Это самостоятельная область исследования, которая все больше проникает в клинику, занимая важное место в неврологии, нейрохирургии, психиатрии, анестезиологии и реанимации.

Какова природа регистрируемой электрической активности головного мозга человека и животных? Вначале считалось, что сложная ЭЭГ определяется такими же биоэлектрическими процессами, какие регистрируются в периферических нервах, т. е. суммарные электрические колебания коры являются следствием временной дисперсии составляющих их потенциалов действия, возникающих в нервных клетках коры. Развитие микроэлектродной регистрации активности нервных клеток поставило под сомнение существовавшее ранее представление об ЭЭГ как результате суммирования потенциалов действия нервных клеток. Показано, что импульсная активность нейронов более чувствительна к ухудшению функционального состояния центральной нервной системы, нежели сум-

марная ЭЭГ. Так, наркоз полностью подавляет импульсную активность корковых нейронов, ЭЭГ в этот же период регистрируется. Существует несоответствие между активностью нейронов и ЭЭГ в одном и том же участке коры: в момент активации ЭЭГ импульсная активность подавлялась. Следовательно, суммарная активность мозга должна определяться более длительными, градуальными электрическими процессами, такими, как синаптические и дендритные потенциалы. Открытие синаптических возбуждающих и тормозных потенциалов и новые данные о свойствах дендритов привели к формированию гипотезы, рассматривающей суммарную электрическую активность как результат суммации в основном постсинаптических градуальных потенциалов корковых нейронов, где наиболее важная роль принадлежит дендритам. ЭЭГ возникает в обширной сети дендритных ветвлений. Такое положение подкрепляется рядом фактов: в онтогенезе формирование электрической активности коры совпадает с созреванием ее апикальных дендритов; наличие широких дендритных ветвлений, составляющих основную массу коры; хорошо выраженные медленные колебания в области ветвления дендритов. В формировании ЭЭГ, регистрируемой с поверхности коры, отражаются не только постсинаптические процессы апикальных дендритов, но постсинаптические потенциалы сомы и базальных дендритов пирамидных нейронов. Таким образом, ЭЭГ отражает ВПСП апикальных дендритов корковых нейронов и ВПСП и ТПСР глубоких частей пирамидных нейронов, их сомы и базальных дендритов.

Известна связь некоторых медленных колебаний мозга с функциями глиальных элементов. Глиальные клетки занимают от 30 до 50% серого вещества мозга, тесно прилегая к нейронам. Найдены синаптические контакты на олигодендроцитах коры, что подтверждает возможность распространения импульсов к глиальным клеткам. Электронная микроскопия показала нейроглиальные связи с олигодендроцитами и астроцитами. Предположение, что глия участвует в происхождении ЭЭГ, высказывают многие авторы. Электрогенез ряда медленных и сверхмедленных колебаний потенциала в коре больших полушарий и других отделах мозга связывают с глиальными клетками.

В условиях полного покоя и отсутствия внешних раздражений у человека и животного регистрируют спонтанно изменяющуюся ЭГ-активность головного мозга, что обусловлено постоянной синаптической бомбардировкой нейронов коры притоком афферентных сигналов от различных рецепторов и других нейронов. Приток афферентных сигналов из сенсорных систем является существенным фактором, влияющим на формирование фоновой активности. Такие рецептивные образования, как зрительный и вестибулярный аппараты, могут рассматриваться как стимуляторы, поддерживающие тонус центральной нервной системы. Лишение нервного центра притока афферентной сигнализации приводит к частичному или полному исчезновению фоновой электрической активности, либо к резкому изменению ее частоты.

При физиологическом покое и отсутствии каких-либо раздражений, кроме синаптической бомбардировки от рецепторов, большое значение имеют сигналы от рецепторов внутренних органов, сосудистой системы, дыхательного центра. Большое влияние на характер фоновой активности коры оказывают также сигналы, поступающие из подкорковых образований и, в первую очередь, со стороны РФ и таламических ядер.

ЭЭГ у бодрствующего человека в состоянии покоя и расслабления не зависит от дыхания и ритма сердечных сокращений. Основными компонентами спонтанной поверхностной ЭЭГ здорового взрослого человека считают два рода ритмических колебаний потенциала — альфа- и бета-волны. Альфа-волны характеризуются частотой от 8 до 13 имп/с и возникают у человека при исключении зрительных раздражений (выключение света или закрытие глаз в состоянии покоя). Альфа-ритм характерен для человека, но регулярная медленноволновая активность наблюдается и в ЭЭГ животных при наркозе и в состоянии бодрствования. У большинства людей альфа-ритм хорошо выражен, амплитуда альфа-волн не превышает 50—100 мкВ. Альфа-ритм отчетливее выявляется в темноте при закрытых глазах, когда испытуемый лежит спокойно, без напряжения мышц головы и без усиленной умственной работы. Открытие глаз, освещение, умственная работа и волнение приводят к угнетению альфа-ритма (рис. 105). Наибольшая регулярность и амплитуда альфа-ритма регистрируется в теменной об-

ластин коры на границе с затылочной. Эта область считается центром формирования альфа-волн в ЭЭГ.

Бета-волны доминируют в ЭЭГ человека и животных при деятельном состоянии, интенсивной физической и умственной работе, осуществлении ориентировочных и условных рефлексов. Бета-ритм состоит из быстрых волн длительностью до 40—50 мс и частотой 14—30 колебаний/с и определяется деятельностью нервных кругов и цепочек коры, что наблюдается обычно при активном состоянии РФ ствола головного мозга, ибо при ее блокаде бета-ритм исчезает. Амплитуда бета-волн достигает 60 мкВ при отведении от коры и не превышает 5—10 мкВ при отведении ЭЭГ от кожи черепа у человека. Лучше всего бета-ритм выявляется в лобных областях коры. При усилении умственной деятельности, при подаче условного сигнала амплитуда бета-волн увеличивается, напротив, при наркозе, вызванном барбитуратовыми препаратами, бета-ритм ослабевает и исчезает. В ЭЭГ человека и животных остаются только медленные колебания типа дельта-волн. Дельта-ритм состоит из ритмических медленных волн длительностью от 250 до 1000 мс. Частота колебаний 1—4 в секунду. Дельта-ритм выявляется при наркотическом сне или при поражениях кортикальных отделов мозга, его регистрируют и в ЭЭГ здорового человека во время сна с амплитудой, не превышающей 20—30 мкВ.

В ЭЭГ человека может регистрироваться активность типа *тета-ритма*, характеризующаяся частотой 4—8 колебаний/с. Ряд исследователей считает, что у человека самостоятельного тета-ритма не существует, и относят его к промежуточной активности между дельта- и альфа-ритмами. Выраженность тета-ритма в ЭЭГ зависит от возраста испытуемого, фона основной активности и степени умственного напряжения. У животных тета-ритмическая активность лучше всего выражена в лимбических структурах мозга, промежуточном мозге и стволе при общей активизации животного, вызванном каким-либо раздражением. Впервые тета-ритм был зарегистрирован в гиппокампе, где он наиболее отчетливо выражен.

Изменения фоновой ак-

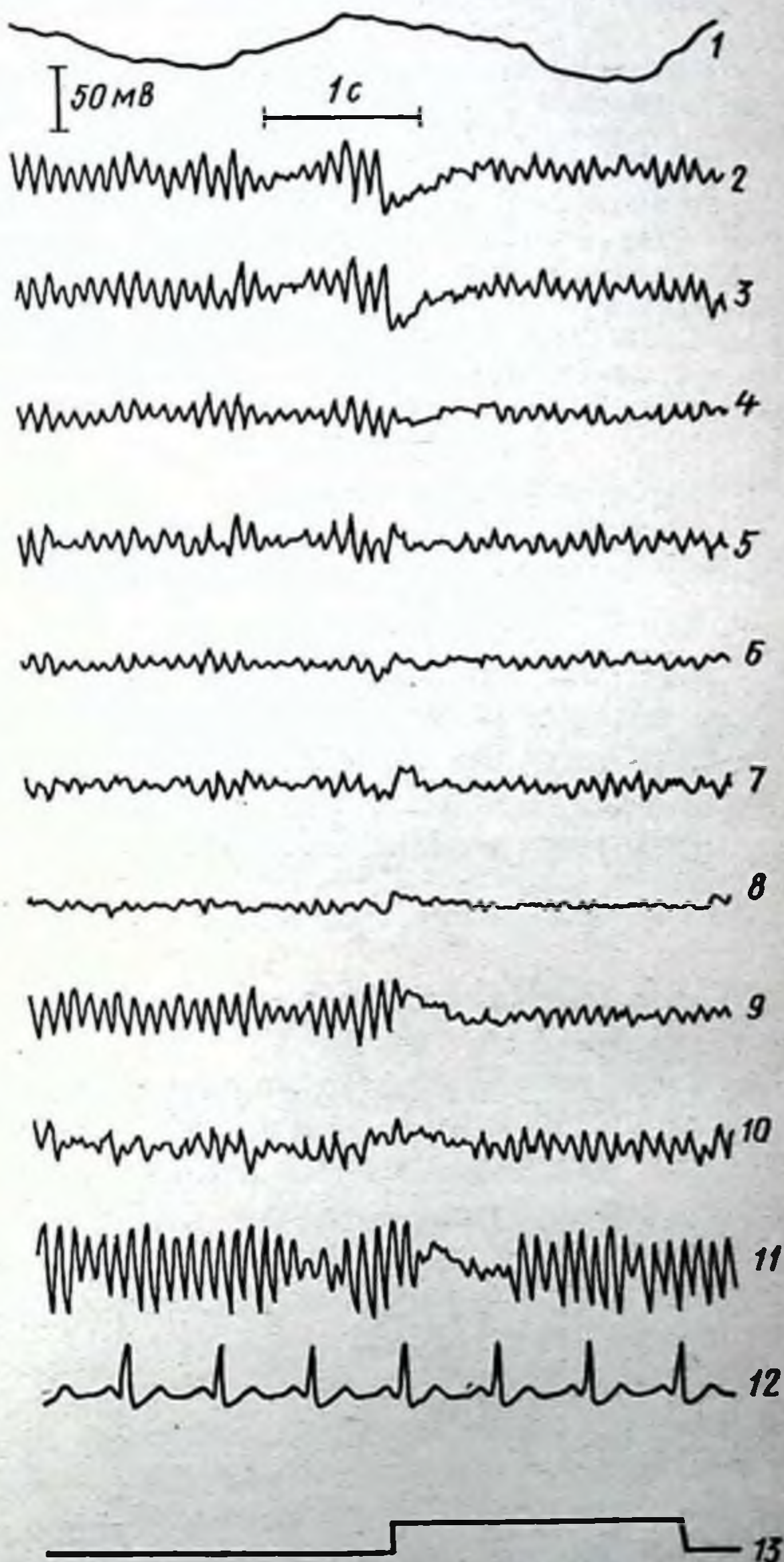


Рис. 105. Реакция депрессии альфа-ритма при непрерывном освещении глаз (по В. Б. Гречину, 1977):

1 — пневмограмма, 2—11 — униполярная регистрация ЭЭГ, 12 — ЭКГ, 13 — отметка раздражения

тивности структур головного мозга животных и человека возникают при воздействии внешних раздражителей, смене сна и бодрствования, ориентировочной и условно-рефлекторной деятельности, раздражении мозговых структур. Раздражения, приводящие к пробуждению животного и бодрствованию, сопровождаются сменой в ЭЭГ медленных ритмов на низковольтную быструю активность. Эта реакция названа *реакцией активации* и носит генерализованный характер. Прямое раздражение РФ ствола мозга воспроизводит все изменения, характерные для активации, связанной с бодрствованием, поэтому реакцию активации называют также *реакцией пробуждения*, или *arousal reaction*. Для реакции активации применяют также термин *десинхронизация*.

Реакции активации противопоставляют *реакцию инактивации*, связанную со снижением уровня возбуждения в коре. Эта реакция выражается в появлении альфа-ритма вместо быстрой низкоамплитудной активности, дельта- и тета-волн вместо альфа- и бета-ритмов, в дальнейшем замедлении и возрастании амплитуды медленных волн, присутствующих в фоновой активности.

Помимо медленных дельта- и тета-волн в коре головного мозга регистрируют сверхмедленные колебания постоянного потенциала, подразделяющиеся по временному параметру на секундные, минутные, многоминутные и часовые. Эти изменения составляют особую форму регуляции состояния мозга и связаны с уровнем сна-бодрствования, проявлением психической деятельности человека, отражают метаболические процессы.

З а д а ч а. Регистрация электроэнцефалограммы человека

Методика. Регистрация ЭЭГ представляет собой непрерывную запись величин разности потенциалов между двумя точками мозга. Отведение потенциалов производят с помощью специальных контактных электродов, приложенных к поверхности кожи на голове.

Электроды должны обладать малым переходным (электрод — кожа)

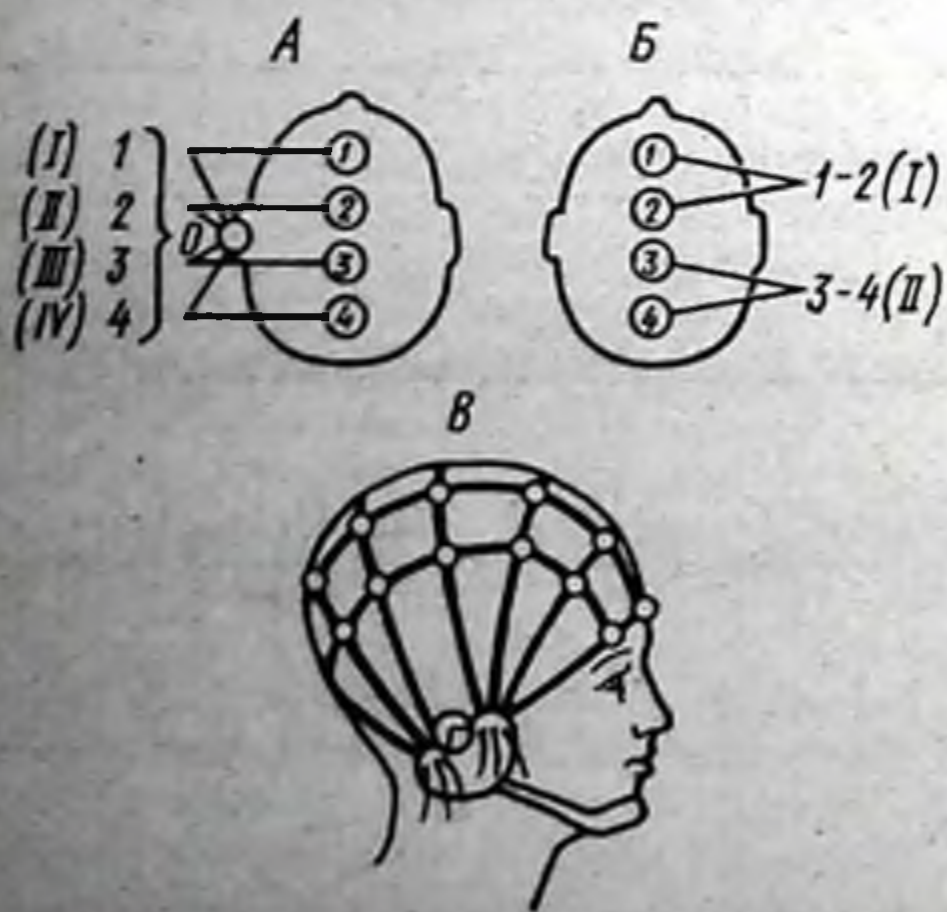


Рис. 106. Регистрация ЭЭГ у человека. А, Б — монополярное и биполярное отведения; В — шлем для крепления электродов:

1—4 — активные электроды, 0 — референтный (индифферентный) электрод; I—IV — каналы регистрации ЭЭГ

сопротивлением, минимальной поляризацией и антикоррозийными свойствами. Для уменьшения сопротивления кожи, контактирующей с электродом, ее обрабатывают жирорастворяющими веществами (этиловый спирт, или смесь из ацетона, спирта и эфира). На голове электроды закрепляют с помощью специальных эластичных шлемов, обеспечивающих надежную фиксацию электродов и малобеспокоящих пациента. К электродам присоединяют проводники, обладающие высококачественной изоляцией и служащие для подключения электродов на вход электроэнцефалографа.

Существует два способа регистрации ЭЭГ: *монополярный* и *биполярный*. При монополярном отведении один из двух электродов, под-

ключаемых на каждый канал электроэнцефалографа, является общим для всех каналов (рис. 106). Такой электрод называют *референтным* и для его крепления выбирается участок, куда менее всего передаются колебания электрических потенциалов мозга или где они проявляются слабее. В качестве такой точки чаще всего используют мочку уха или переносицу.

При биполярном отведении на каждый канал подключают два независимых электрода, каждый из которых располагается на активной точке.

Испытуемого помещают в специальную экранированную камеру, что уменьшает возможность появления артефактов. Он должен лежать или полулежать в удобном кресле. Во время записи ЭЭГ мускулатура испытуемого должна быть расслаблена.

Для работы используют 4-канальный электроэнцефалограф типа ЭЭГ-4. Перед началом работы необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации прибора, убедиться в его исправности.

Ход работы. 1. Надеть на голову испытуемого шлем-сетку так, чтобы он хорошо прилегал к коже, но не беспокоил.

2. Выбрать способ отведения ЭЭГ — монополярный или биполярный — и определить точки на голове, где должны быть расположены электроды. На этих участках раздвинуть волосы, протереть кожу для обезжиривания спиртом и на кусочки марли, смоченные физиологическим раствором, наложить электроды, прижимая их эластичными шнурами шлема. Электроды должны быть распределены над конвексальной поверхностью больших полушарий таким образом, чтобы равномерно охватить лобные, центральные, теменные, затылочные и височные области полушарий.

3. Направить испытуемого в экранированную камеру, где он садится в удобной позе. Подключить электроды к распределительному щитку.

4. Начать запись с регистрации калибровочного сигнала, а затем регистрировать ЭЭГ.

5. После записи фоновой активности применить некоторые функциональные пробы. А. *Пробу с открыванием и закрыванием глаз* проводить после адаптации испытуемого к темноте. После сигнала «открыть глаза», отмечаемого на ЭЭГ появлением артефакта «моргания», наступает десинхронизация, проявляющаяся в угнетении альфа-ритма ЭЭГ. По сигналу «закрыть глаза» альфа-ритм восстанавливается. Б. *Ритмическая фотостимуляция* приводит к «реакции усвоения ритма», т. е. мелькающий свет вызывает перестройку фоновой ритмики соответственно частоте ритмических раздражений. В ЭЭГ появляется ритмическая активность с частотой, равной или кратной предъявляемой частоте фотостимуляции. Установить источник света (газоразрядная лампа с энергией вспышки 0,3 Дж) на расстоянии 12 см от глаз испытуемого строго по средней линии. Подавать короткие сигналы (не более 20 мс, частоты вспышек 1—35 в секунду, длительностью серии 10 с.) В. *Психологические тесты* провести, когда испытуемый находится в удобной позе при максимальном расслаблении мышц с за-

крытыми глазами. Предложить испытуемому вначале простое вычитание: трех от ста с дальнейшим вычитанием трех от каждой разности до нуля, так быстро и точно, как может испытуемый, а затем сложное вычитание по тому же принципу 17 из 981 и так далее до 0. Регистрировать угнетение альфа-ритма в момент умственного напряжения.

Обработка результатов. Анализируют полученную запись активности мозга; подсчитывают частоту основных ритмов, амплитуду потенциалов, определяют наличие в ЭЭГ альфа- и бета-ритмов. Анализируют результаты примененных функциональных проб.

Рекомендуемая литература: [20] — с. 7—157; [39] — с. 6—33; [12] — с. 236—253; [9] — с. 17—36; [66] — с. 605—656.

Раздел IV

РЕЦЕПЦИЯ РАЗДРАЖЕНИЙ

Настоящий раздел практикума знакомит студентов-физиологов с некоторыми общими закономерностями работы рецепторных образований. Задачи практикума рассматривают способы кодирования рецепторами количественных и качественных признаков стимула, развитие процессов адаптации, пути регуляции рецепторной активности.

Рецепторы — специализированные образования различного уровня организации от свободных нервных окончаний до сложно устроенных органов чувств — приспособлены для восприятия раздражений внешнего мира и внутренней среды организма. Каждый тип рецепторов реагирует на стимуляцию определенного вида, специфическую, или «адекватную», для него. В рецепторах совершается трансформация энергии внешнего стимула в характерный для организма процесс нервного возбуждения.

Деятельность рецепторов демонстрируется на примере двух групп сенсорных образований: хеморецепторов языка — *вкусовые рецепторы* — и механорецепторов кожи — *тактильные рецепторы*. Экспериментальные задачи разработаны на холоднокровных животных с использованием электрофизиологического метода исследования — о состоянии рецепторов судят по уровню импульсной активности в афферентных нервных проводниках.

Данные рецепторные приборы — удобный объект для решения поставленных в практикуме задач. Исследуемые сенсорные органы различны как в морфологическом, так и в функциональном отношении. Они принадлежат к двум принципиально отличающимся группам рецепторов, тактильные — «первичночувствующие», вкусовые рецепторы — «вторичночувствующие». Они «настроены» на восприятие качественно различных стимулов, отличаются характером афферентного разряда, продолжительностью адаптации и пр.

ТЕМА I. ФИЗИОЛОГИЯ ВКУСОВОГО РЕЦЕПТОРА

Вкусовые рецепторы играют важную роль в жизни организма, определяя вместе с обонятельными рецепторами пищевые поведенческие акты. Возбуждение вкусовых рецепторов приводит к рефлекторному выделению пищеварительных секретов.

Структура. Рецепторы вкуса позвоночных животных имеют сходное строение и представлены *вкусовыми луковицами*. Это — образования овальной или колбовидной формы, состоящие из 3 типов клеток: рецепторных, или вкусовых, опорных и базальных. Вкусовые клетки — веретеновидные, тянутся от основания до вершины луковицы, опорные — расположены между ними, базальные — у основания луковицы (рис. 107, А, Б).

Вершина вкусовой луковицы млекопитающих не доходит до поверхности эпителия, а открывается во *вкусовую ямку*, заполненную аморфным веществом. Вкусовые клетки несут на апикальном конце многочисленные тонкие выросты — *микровиллы*, погруженные в жидкость вкусовой ямки. У амфибий луковицы не имеют вкусовой ямки и всей поверхностью соприкасаются с внешней средой. Их рецепторные клетки пальцевидно разветвлены, толстые и короткие микровиллы немногочисленны. Микровиллам рецепторных клеток придают основное значение в восприятии вкусового раздражения, так как предполагают, что их мембрана содержит специфические «рецептивные белки».

Вкусовые луковицы млекопитающих сосредоточены в различного типа вкусовых сосочках языка, часть их лежит свободно в эпителии ротовой полости, глотки, пищевода. Вкусовые луковицы лягушки расположены в грибовидных сосочках языка по одной луковице на вершине сосочка. На языке лягушки насчитывается около 500 сосочков диаметром 100—200 мкм. Вкусовые клетки имеют эпителиальное происхождение и обновляются в течение 5—7 дней.

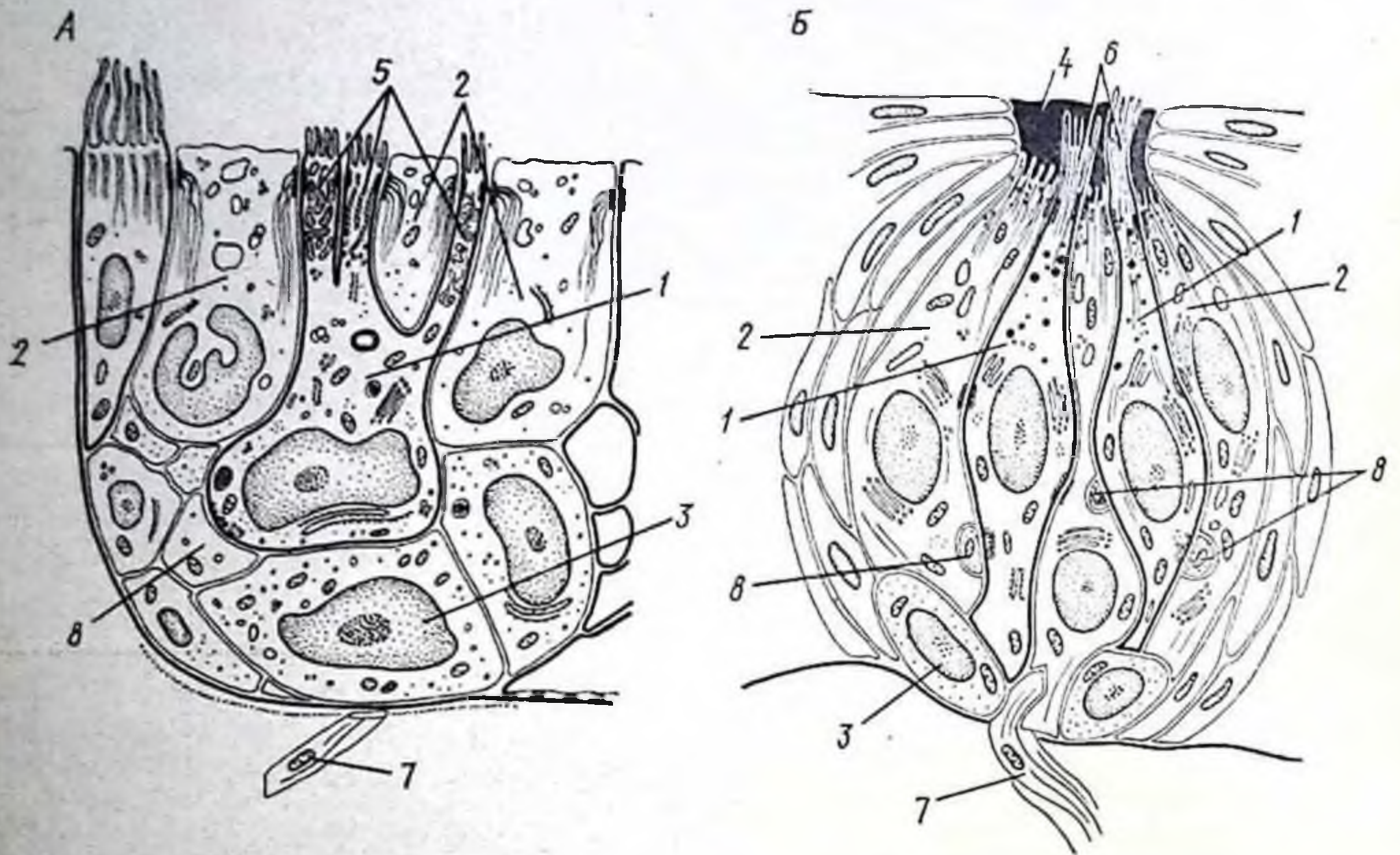


Рис. 107. Ультраструктурная организация вкусовой луковицы амфибий (травяная лягушка — А) и грызунов (кролик — Б) (по Р. А. Певзнер, 1978):

1 — рецепторная клетка, 2 — опорная клетка, 3 — базальная клетка, 4 — вкусовая ямка, 5 — цитоплазматические отростки, 6 — микровиллярный аппарат, 7 — нервное волокно, 8 — нервное окончание

Иннервация вкусовой области млекопитающих проходит в составе VII, IX и X пары черепно-мозговых нервов. Грибовидные сосочки лягушки иннервированы волокнами язычного нерва (ветвь языкоглоточного, IX). Нервные волокна, подходя к сосочку, многократно ветвятся, теряют миелиновую оболочку и проникают во вкусовую луковицу, образуя на вкусовых клетках два вида синаптических контактов — афферентные и эфферентные. Тип контакта можно определить по локализации везикул в синаптической области: в случае афферентного контакта они располагаются в области вкусовой клетки, примыкающей к нервному окончанию, эфферентный синапс содержит везикулы в нервном окончании. Природа медиаторов этих синапсов окончательно не установлена.

В области вкусовых сосочков обнаружена высокая активность фермента холинэстеразы, что указывает на участие ацетилхолина в деятельности рецептора. Некоторые исследователи отводят ему роль медиатора в эфферентных синапсах. В клетках вкусовой луковицы найдено значительное содержание биогенных аминов серотониновой природы, возможно они функционируют как медиаторы при формировании возбуждения в афферентных окончаниях.

Характеристика специфической чувствительности рецепторных элементов. Каждая вкусовая луковица получает иннервацию от нескольких афферентных волокон, в то же время одно нервное волокно, разветвляясь, снабжает несколько луковиц, несколько клеток в одной луковице.

Раздражение вкусовыми веществами одиночных сосочков человека и животных показывает, что приблизительно 25—30% сосочков чувствительны к одному из 4 основных вкусовых стимулов, остальные — к двум, трем или даже

четырем. Микроэлектродные исследования обнаружили среди вкусовых рецепторных клеток как «мономодальные», т. е. реагирующие только на один вид вкусового раздражения, так и «полимодальные», отвечающие на 2—4 вкусовых качества, хотя последние развивают наибольший ответ на один из типов стимуляции. Этими особенностями вкусового аппарата объясняют отсутствие строгой «специфичности» большей части афферентных волокон вкусового нерва.

Вкусовые качества. Механизм первичных процессов. Существует четыре основных вкусовых качества — соленое, кислое, горькое и сладкое. *Соленым вкусом* обладают многие соли, но чистый соленый вкус присущ только поваренной соли. Вкус каждой соли определяют свойства катиона (возбуждающее влияние) и аниона (тормозящее). *Кислый вкус* — свойство всех кислот, обусловленное в основном H^+ , хотя определенную роль в его создании играют анионы и недиссоциированные молекулы (особенно для вкуса органических кислот). *Горький и сладкий вкус* дают вещества разнообразного строения, что затрудняет поиски особенностей структуры молекул, ответственных за создание вкуса. Одна из наиболее разработанных сейчас гипотез связывает вкус вещества (горький или сладкий) с наличием в его молекуле определенных группировок и особенностями их расположения и взаимосвязей.

Вкусовые рецепторы многих животных возбуждаются под действием дистиллированной и водопроводной воды. Механизм «водного ответа» по одной точке зрения связан с содержанием в воде небольших количеств ионов Ca^{2+} , являющегося сильным возбудителем вкусовых рецепторов. Согласно другой точке зрения «водные ответы» генерируются процессом удаления солей с поверхности языка, и ответ на воду связан с изменением диффузионного потенциала солей, адсорбированных на рецепторной мембране. Подтверждением этого мнения служит тот факт, что «водный ответ» хорошо проявляется после предварительного воздействия на язык растворов солей или Рингера, а также возможность подавления этого ответа добавлением в воду небольших количеств электролитов.

Природа взаимодействия вкусового агента с рецептором еще не ясна. Согласно наиболее признанной концепции Л. Бейдлера первичное взаимодействие представляет собой адсорбцию вкусового вещества на активных центрах рецепторной мембраны. Интенсивность вкусовой реакции зависит от количества молекул раздражителя и числа соответствующих ему активных центров. Допускают существование на мембране одной вкусовой клетки различных активных центров, что дает ей возможность реагировать с веществами разного вкусового качества. Вкусовая стимуляция ведет к конформационным перестройкам молекул активных центров и, как следствие этого, изменению ионной проницаемости мембраны и развитию рецепторного потенциала.

Данные последних лет свидетельствуют о вероятности существования различных молекулярных механизмов хеморецепции по отношению к стимулам разного вкусового качества. Адсорбционная теория экспериментально подтверждена для веществ, обладающих сладким вкусом: из вкусовых луковиц выделены специфические «сладко-чувствительные» белки-рецепторы. Менее определены данные о наличии подобных белков для горьких веществ; некоторые исследователи главную роль в рецепции горечи отводят фосфолипидным структурам мембраны. В рецепции солей и кислот допускают участие OH^- -группы. Существует мнение, что рецепторный потенциал может возникать не вследствие изменения ионной проницаемости мембраны, а как результат влияния вкусовых агентов (солей) на фазный граничный потенциал мембраны.

Важную роль в актах химического восприятия раздражителя рецептором отводят метаболическим процессам. Обсуждается также вопрос о возможном участии ферментов в первичном механизме вкусовой рецепции, при этом особое внимание уделяется ферментным системам, связанным с циклическими нуклеотидами.

Биоэлектрические явления. Процессы электрогенеза в рецепторах обычно рассматривают, используя принцип деления их на две группы — «первичных» и «вторичных» рецепторов, — основанный на различии в принципиальном плане строения и последовательности развития в них возбудительного процесса. «Первичными» («первичночувствующими») называют рецепторы, в которых рецептирующим субстратом является мембрана нервного окончания первого

сенсорного нейрона. К этой группе принадлежат функционально различные рецепторы, представленные свободными нервными окончаниями и инкапсулированными образованиями (обонятельные рецепторы, мышечные веретена, тактильные рецепторы).

Действие раздражителя на рецепторы этой группы, вызывая развитие характерных для них первичных процессов, ведет к изменению ионной проницаемости рецепторной мембраны нервного окончания и ее деполяризации. Деполяризация имеет местный характер, градуальна и называется *рецепторным потенциалом*. Величина, скорость нарастания и продолжительность его зависят от параметров стимула. При повторных раздражениях происходит суммация рецепторных потенциалов. Достигая критического уровня, рецепторный потенциал деполяризует нервное волокно в регенеративной области (ближайший перехват Ранвье) и вызывает здесь появление распространяющегося процесса — потенциала действия. В большинстве рецепторов рецепторный потенциал вызывает не одиночный импульс, а их серию (разряд, залп).

«Вторичные» («вторичночувствующие») рецепторы имеют специализированную рецепторную клетку, обладающую высокой чувствительностью к адекватному раздражителю; рецептирующий субстрат включен в ее мембрану. Клетка связана синаптически с окончанием сенсорного нейрона. Синапсы известных «вторичных» рецепторов (хеморецепторы сосудистых рефлексогенных зон, рецепторы слуха, вкуса и др.) имеют химическую природу, хотя не исключена вероятность существования в этой группе рецепторов и эфиптической формы связи.

Взаимодействие клетки со стимулом через сложную цепь своих первичных процессов приводит к деполяризации ее рецепторной мембраны вследствие изменения ее ионной проводимости. Это явление называют здесь также рецепторным потенциалом. Это — локальный, градуируемый процесс, при нарастании до определенной величины приводящий к выделению медиатора из пресинаптической области клетки. Медиатор деполяризует окончание 1-го сенсорного нейрона, вызывая развитие в нем местной деполяризации, которую принято называть *генераторным потенциалом* (ГП). Величина ГП зависит от количества выделившегося медиатора. При достижении критического уровня ГП формирует разряд импульсов в 1-м перехвате Ранвье.

Удобным объектом для изучения закономерностей функционирования вкусовых рецепторов является рецепторный аппарат языка лягушки, обнаруживающий чувствительность к основным вкусовым раздражителям и доступный для электрофизиологических экспериментов.

Предлагаемые ниже задачи позволяют изучить некоторые функциональные свойства этих рецепторов: чувствительность их к различным видам вкусовой стимуляции; форму кодирования информации о качестве и интенсивности стимула; характер адаптации рецепторов к адекватному раздражителю; регуляцию рецепторной активности.

Методические приемы, являющиеся общими для всех задач данной темы, вынесены в специальный раздел «Общие методические указания», который предшествует описанию задач. Частные особенности методик приведены в соответствующих разделах каждой задачи или опыта.

Общие методические указания

Работу проводят на вкусовых рецепторах травяной лягушки *Rana temporaria*, показателем активности которых служит афферентная импульсация языкоглоточного нерва.

Приборы. Аппаратура для регистрации биопотенциалов: УБП1-02 или УБП2-03, двухканальный осциллограф С1-18 с фоторегистри-

рующим устройством «ФОР» или «Рекордина» или шлейфный осциллограф МПО-2, Н-102 с вибраторами — 1, или 1,5; осциллограф для визуальных наблюдений типа С1-19, С1-20 или др. Отведение биопотенциалов от нерва производят с помощью биполярных серебряных электродов диаметром 0,3—0,5 мм и межэлектродным расстоянием 2—3 мм.

Препаровку осуществляют в залитой воском ванночке с отверстием на дне ее для стока используемых в опыте растворов. Рядом с отверстием, которое должно быть расположено ближе к краю ванночки, впаивают в воск небольшую пробковую пластинку (100—200 мм², высотой 2—4 мм) для закрепления кончика языка животного. Опыт проводят в экранированной камере; приборы, животное, камеру заземляют.

В ходе опыта следует обеспечить хороший отток жидкости с поверхности ванночки, для чего соединяют отверстие ванночки (с нижней стороны) резиновой трубкой с сосудом-приемником или ставят сосуд под ванночку. Блок-схема установки представлена на рис. 108.

Инструменты. Глазные и большие ножницы, два глазных пинцета, острые стеклянные крючки с неоплавленным кончиком.

Материалы. Вата, марля, фильтровальная бумага, булавки, тонкий хирургический шелк, раствор Рингера для холоднокровных, рН 7,2—7,4. Растворы для фоторабот: контрастный проявитель для пленки, фиксаж. При проявлении пленки применяют коррекс или фотобачок большого размера. Используют фотопленку высокой чувствительности — «РФ», «А-2», «КН-4».

Вкусовые раздражители приготавливают на растворе Рингера или дистиллированной воде¹ в следующих концентрациях: глюкоза —

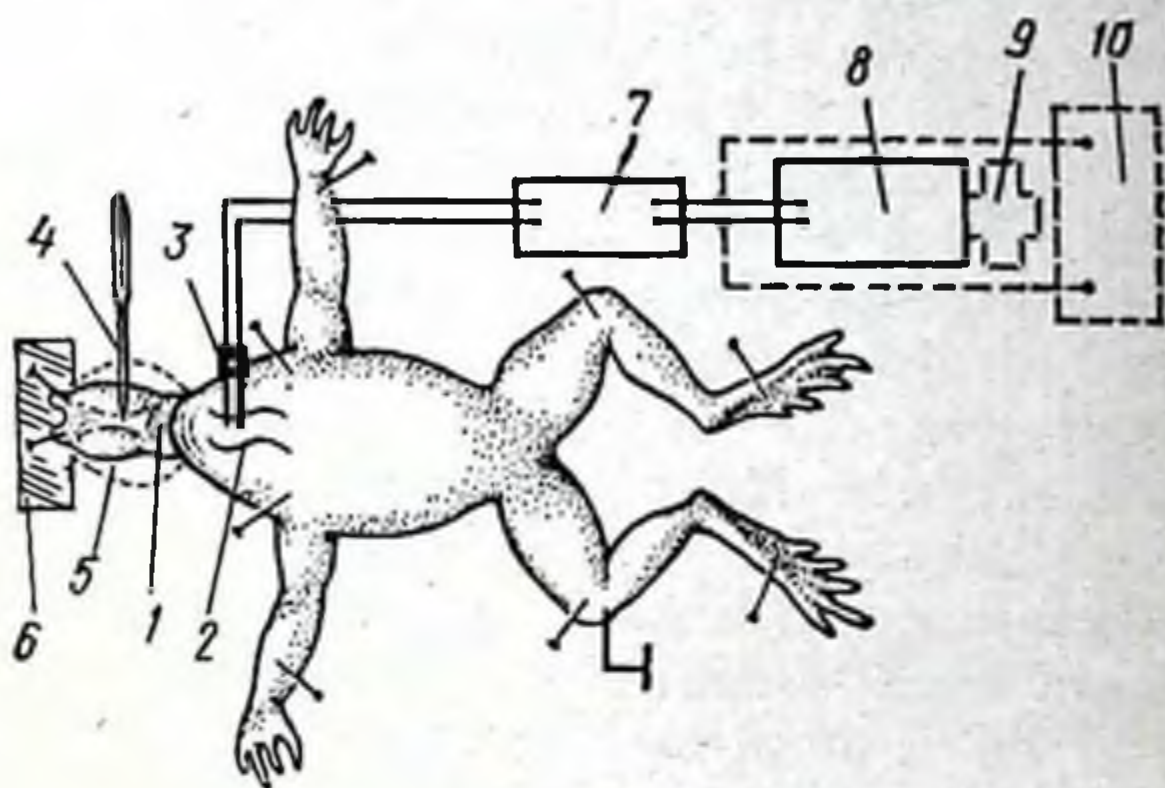


Рис. 108. Блок-схема установки:

1 — язык, 2 — языкоглоточный нерв, 3 — регистрирующие электроды, 4 — пипетка для подачи вкусового раствора, 5 — отверстие в ванночке для стока вкусовых растворов, 6 — пробковая подставка для крепления языка, 7 — УБП, 8 — электронно-лучевой осциллограф, 9 — ФОР, 10 — шлейфовый осциллограф

¹ Дистиллированная вода является стимулятором вкусовых рецепторов лягушки, поэтому использование ее в качестве растворителя вкусовых веществ может привести к интерференции рецепторных ответов. Ввиду этого вкусовые стимуляторы приготавливают на растворе Рингера, к которому рецепторы быстро адаптируются. Однако в этом случае трудно установить истинную чувствительность рецепторов к некоторым стимулам. Так, уровень порога для NaCl будет зависеть от содержания последнего в адаптирующем растворе. Показано, что соли, входящие в состав раствора Рингера, угнетают ответ рецептора на сахара.

0,05—1 моль/л (сахароза 0,03—1), хинин 0,005—10 ммоль/л (кофеин 0,01—30 ммоль/л), NaCl 0,05—1,5 моль/л, кислоты 0,1—30 ммоль/л. Растворы кислот используют не всегда в связи с опасностью попадания их на нерв и депрессирующего действия на рецепторы при применении относительно высоких концентраций.

Приготовление препарата. Обездвиживают животное разрушением центральной нервной системы и иногда добавочным введением подкожно (в область нижних лимфатических сердец) небольших доз миорелаксанта — 0,2—0,4 мл диплацина, тубокурарина и др. Последнее продиктовано тем, что в ряде случаев после разрушения мозга у лягушки могут наблюдаться нерегулярные слабые сокращения групп мышечных волокон дна рта и языка, что мешает электрофизиологической регистрации рецепторного ответа.

Животное помещают на восковую ванночку брюшком вверх и фиксируют булавками за конечности. Передние конечности располагают почти под прямым углом к туловищу, задние — вытянутыми книзу. Фиксируют верхнюю челюсть, вкалывая булавки в углы рта с некоторым наклоном к поверхности ванночки. Одним пинцетом поднимают нижнюю челюсть, другим (анатомическим) — осторожно извлекают язык из ротовой полости, удерживая его за кончики задней, свободной стороны: язык лягушки прикреплен к нижней челюсти передним концом, задний конец его свободен (рис. 109, А).

Язык располагают над отверстием в ванночке дорсальной (рецепторной) стороной вверх. Его слегка расправляют, проводя стеклянной палочкой по вентральной стороне, и закрепляют булавками за кончики на пробковой подставке. Поверхность языка, во избежание подсыхания, покрывают тампоном ваты, обильно смоченным в растворе Рингера, вату снимают только перед началом опыта. Приступают к препаровке нерва. Языкоглоточный нерв препарируют в области мышц дна рта под слоем раствора Рингера. Со дна рта срезают кожу или разрезают ее по центру и, отводя края в стороны, фиксируют на ванночке. Слой субмаксиллярных мышц разрезают по средней линии и отодвигают в стороны. Языкоглоточные нервы расположены в более глубоком мышечном слое, ближе к средней линии. Они хорошо видны, если разрезать соединительную ткань этого слоя в центре и раздвинуть мышцы; несколько латеральнее, более поверхностно расположены подъязычные нервы, в основном моторные (рис. 109, Б, В).

Языкоглоточные нервы проходят вместе с артериальными сосудами языка и связаны с ними соединительнотканными пленками. Острыми стеклянными крючками сосуды отделяют от нервов, стараясь не

Во избежание этих осложнений применяют вкусовые стимуляторы, растворенные в дистиллированной воде, но тестирование их проводят после предварительной кратковременной адаптации к дистиллированной воде (15—30 с). Смывание вкусового вещества с языка (и увлажнение его в интервалах между раздражениями) производят раствором Рингера. В целях сравнения опытных данных и более творческого подхода к эксперименту можно рекомендовать отдельным группам студентов проведение опытов в различных модификациях: с использованием стимуляторов, приготовленных как на растворе Рингера, так и на дистиллированной воде.

повредить те и другие. Удобнее проводить эту препаровку в области надгортанных хрящиков или чуть выше. Нервы освобождают от сосудов и соединительной ткани на протяжении 1 см.

Препаровку нервов проводят сразу с двух сторон, в этом случае один из нервов является «запасным» — до опыта его держат под влажным тампоном.

Для удобства подведения электродов под нерв его заранее берут на тонкую шелковую лигатуру. При всех манипуляциях нерв не на-

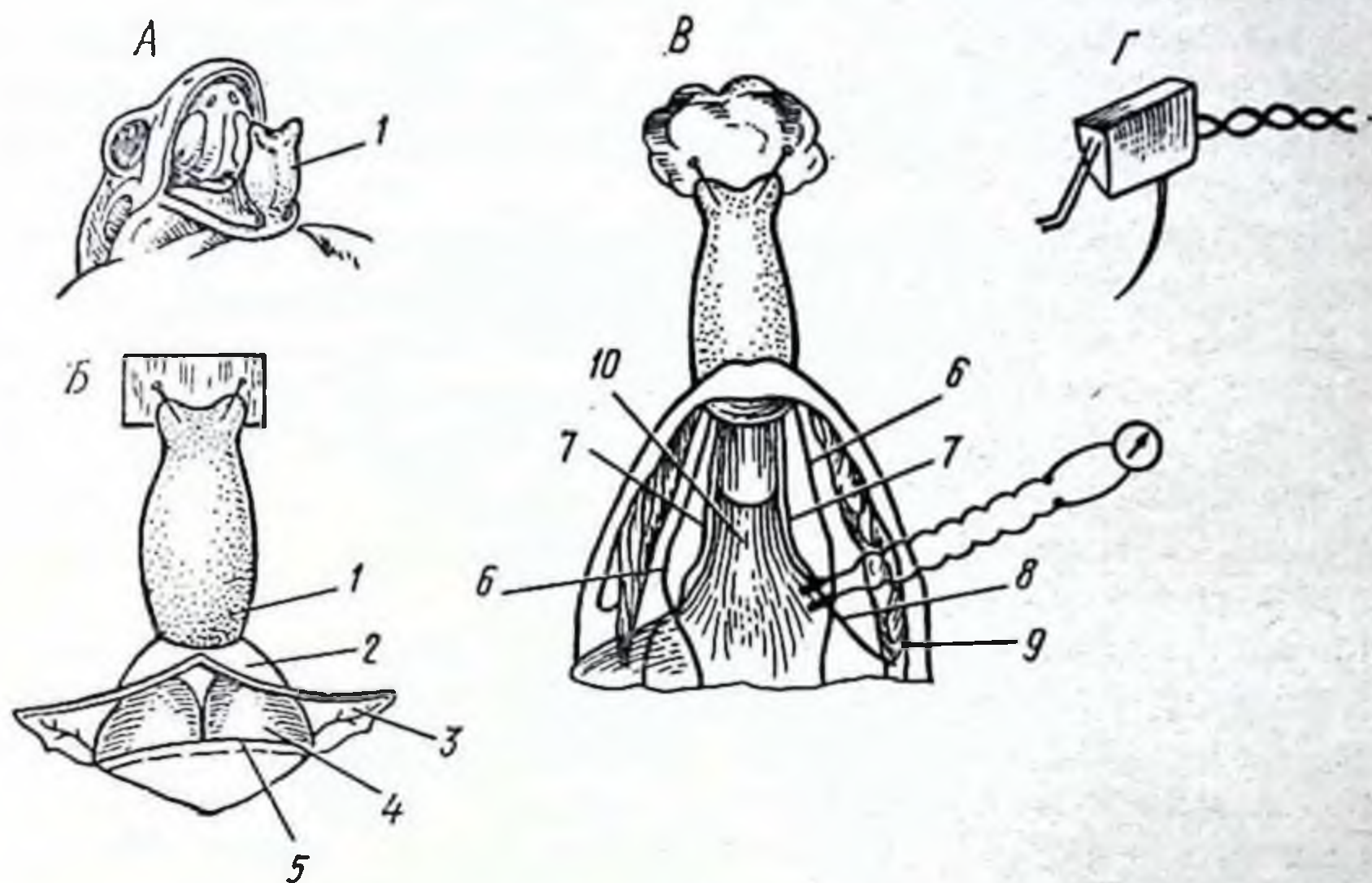


Рис. 109. Препаровка языкоглоточного нерва. А — расположение языка лягушки в ротовой полости; Б — снятие кожи с дна рта (виден поверхностный слой мышц); В — разрез соединительных тканей и нахождение языкоглоточного нерва; Г — регистрирующие электроды:

1 — дорсальная поверхность языка, 2 — нижняя челюсть, 3 — кожа, 4 — подчелюстная мышца, 5 — подъязычная мышца, 6 — подъязычный нерв, 7 — языкоглоточный нерв и язычная артерия, 8 — языкоглоточный нерв, 9 — подборочно-подъязычная мышца, 10 — подъязычно-язычная мышца

тягивать! После подведения под нерв электроды плотно фиксируют на ванночке специальной иглой (см. рис. 108); для плавной регулировки подведения электродов их можно укрепить в простейшем манипуляторе — препаратоводителе.

На электродах во время регистрации процесса не должно быть жидкостной пленки, ее удаляют фильтровальной бумагой, но не ватой, от которой может остаться на электродах незаметный шунтирующий волосок. Вне записи процесса нервы закрывают влажным тампоном; если промежутки между регистрацией короткие (2—3 мин), лучше закрывать нерв влажной фильтровальной бумагой; это облегчит в последующем удаление жидкости с электродов. Следует обратить внимание, что при работе в условиях, требующих частого увлажнения препарата, жидкостная пленка обычно образуется в основании рабочей части электродов, т. е. у места выхода их из крепящей колодки. Этот учас-

ток нужно проверять в первую очередь при подозрении на шунтирование — подсушивать его фильтровальной бумагой. Не следует держать нерв «сухим» более 1—2 мин; если необходима продолжительная непрерывная запись, нерв на все время опыта заливают тонким слоем вазелинового масла.

Подготовка к работе. Перед началом эксперимента следует определить технические условия ведения опыта (параметры усиления и регистрации) и пригодность препарата для опыта (способность его реагировать на вкусовые раздражители).

В целях проверки технических условий ведения опыта можно использовать любой препарат, даже невысокой чувствительности, но реагирующий на какой-либо вкусовой раздражитель, в том числе и на водопроводную воду.

Полосу пропускания на УБП устанавливают от 300 до 10 000 Гц, усиление — около 50 мкВ = 10—15 мм. Яркость и резкость луча осциллографа, положение луча на пленке, скорость регистрации процесса, продолжительность каждого кадра записи и пр. определяют, проводя несколько пробных регистраций вкусового ответа. Рецепторный ответ записывают на пленку при 3 скоростях ее движения (25, 50 и 100 мм/с). Пленку проявляют и устанавливают необходимые условия регистрации процесса.

Проверяют пригодность препарата для проведения эксперимента. С этой целью дорсальную поверхность языка орошают из тонких глазных пипеток равного объема растворами исследуемых вкусовых веществ в средней концентрации и водопроводной водой (примерно растворы NaCl 0,5—0,7 моль/л, глюкозы 0,2—0,4 моль/л, солянокислого хинина 0,1—0,5 ммоль/л). Вкусовой раздражитель оставляют на языке 3—5 с и смывают раствором Рингера. Интервалы между раздражениями 1—2 мин (нерв на это время покрывают влажной фильтровальной бумагой). По картине, возникающей на экране осциллографа, следят за интенсивностью вызываемого раздражителем импульсного ответа и оценивают относительную чувствительность рецепторов к раздражителям.

Используемый препарат должен давать заметный ответ на большую часть упомянутых вкусовых растворов, амплитуда импульсов в ответе допустима не ниже 20—40 мкВ. В афферентном разряде вкусового нерва лягушки амплитуда импульсов имеет разброс от 20 до 80 мкВ, наиболее часто встречающиеся значения — 30—50 мкВ. Более низкая амплитуда может быть обусловлена плохим функциональным состоянием препарата (повреждение нерва или рецепторной поверхности языка), наличием жидкостной пленки в межэлектродном участке, не отделенными от нерва сосудом или соединительной тканью и пр.

Вне раздражения вкусовые рецепторы имеют невысокую частоту фоновой, спонтанной активности. Ее уровень обычно является показателем чувствительности рецепторов к адекватным стимулам. Слишком высокая частота спонтанной импульсации может быть следствием ухудшения состояния препарата — подсыхания нерва, попадание на него вкусовых раздражителей и т. д.

Приступая к работе, следует сначала записать калибровочный сиг-

нал (25—50 мкВ) и спонтанную активность. Запись калибровочного сигнала помимо своего основного назначения может служить отметкой для разделения опытов на пленке друг от друга.

Запись любого процесса на пленке в течение хода работы необходимо сопровождать протоколами опыта (номера кадров, вид регистрируемого процесса, его характерные особенности и т. д.).

Цель работы. Определить порог чувствительности рецепторов к основным вкусовым раздражителям. Выявить характерные особенности импульсного ответа рецепторов на стимулы разного вкусового качества. Установить зависимость между силой вкусового стимула и величиной ответа рецепторов. Рассмотреть характер афферентной импульсации при изменении числа активных рецепторных единиц.

З а д а ч а 1. Кодирование качества и интенсивности раздражения вкусовыми рецепторами языка лягушки

Кодирование информации в рецепторах основано прежде всего на частотном и числовом принципе. Нанесение вкусового раствора на язык животного сопровождается появлением афферентного импульсного разряда, временная структура которого такова: в первые десятки, сотни миллисекунд ответа достигается максимум частоты импульсов; время развития максимума разряда и его продолжительность различны для веществ, обладающих разным вкусом (быстро — для солей, медленно — для сахаров). Вслед за быстрой частью ответа происходит его снижение до более низких значений частоты. На таком уровне ответ может удерживаться в течение нескольких секунд и десятков секунд. Эту фазу ответа называют *стадией устойчивого разряда*. После этого импульсация постепенно приближается к уровню спонтанной активности.

Об увеличении интенсивности раздражителя рецепторы сигнализируют в центры возрастанием частоты афферентной импульсации. При этом может изменяться как частота импульсов в разряде, так и продолжительность самого разряда, что ведет к увеличению общей численности посылки сигналов. Возрастание интенсивности стимула не только повышает активность каждого работающего элемента, но и увеличивает число активных элементов, возбуждая рецепторы с более высоким порогом раздражения. Обычно возбуждение одной рецепторной единицы не является информативным для центров, только совокупное их функционирование может создать целостную картину действующего стимула.

Между частотой афферентных импульсов и силой стимула для большинства рецепторов существует логарифмическая зависимость: частота импульсации возрастает пропорционально логарифму интенсивности стимула. Однако не все рецепторы (или не весь силовой диапазон раздражителя для данного рецептора) подчиняются этой закономерности, в ряде случаев большее соответствие представляет степенная зависимость, а иногда — «S»-образная. Логарифмические отношения имеют место между рецепторным потенциалом и интенсивностью стимула; между частотой импульсов и величиной рецепторного потенциала — прямо пропорциональная зависимость.

Для вкусовых рецепторов отношение «доза — эффект» (сила стимула — частота афферентного разряда) может выражаться как логарифмической, так и степенной функцией, что определяется принадлежностью стимула к вкусовому качеству и его интенсивностью. Тип соотношения может меняться в пределах одной вкусовой модальности в зависимости от исследуемого диапазона интенсивности.

Первоначальный анализ качественных признаков стимула осуществляется уже на уровне самих рецепторов. Морфофункциональные особенности рецепторов определяют их селективную чувствительность к адекватному стимулу, диапазон воспринимаемых раздражений.

Кодирование качества вкусового раздражения достигается, видимо, наряду с сигнализацией в волокнах специфической модальности пространственно-вре-

менным распределением импульсов в популяциях афферентных волокон. Принцип *пространственно-временной структуры ответа* предполагает, что активность одного волокна не может нести информацию о природе стимула, она передается в популяции афферентных волокон (структура распределения по волокнам — пространственная структура), а также, что форма и динамика импульсного ответа сенсорных волокон на данный тип раздражения своеобразны (временная структура ответа волокон).

Поскольку временная структура импульсных разрядов сходна для раздражителей одной модальности и отличается для разнокачественных стимулов, что особенно заметно на первых секундах ответа, возникло предположение о возможности кодирования вкусового качества последовательностью нервных импульсов в группах параллельно возбуждаемых афферентных волокон. Центральная часть вкусового анализатора распознает эти профили сигналов всего ансамбля волокон.

Сигнальным значением качества стимула, вероятно, является латентный период импульсного ответа. Продолжительность его неодинакова для различных стимулов: он наиболее продолжителен для веществ сладкого вкуса; самый короткий для солей; кислоты и горечи занимают промежуточное положение; измеряется от десятков до сотен миллисекунд.

Опыт 1. Определение порога чувствительности вкусовых рецепторов к основным вкусовым раздражителям

Методика. «Приборы», «инструменты», «материалы», «приготовление препарата», «подготовка к опыту» — см. «Общие методические указания». Проводят тестирование вкусовых растворов в порядке возрастания их концентрации, начиная с заведомо подпороговых. Интервалы времени между стимуляциями — 2 мин; последовательность определения порога к тем или иным вкусовым качествам любая. Пробы вкусовых растворов записывают на пленку, так как выявить истинный порог чувствительности визуально, по картине, наблюдаемой на экране осциллографа, практически невозможно.

На пороговую концентрацию раздражителя ответ рецепторов выражается в незначительном повышении уровня спонтанной активности на несколько секунд.

Ход работы. 1. Включить отметку времени. Записать калибровочный сигнал (2—3 с).

2. Снять с нерва «увлажнитель» и убедиться в отсутствии шунтирования: на экране осциллографа должна быть видна редкая спонтанная импульсация амплитудой 15—30 мкВ, уровень шумов должен соответствовать выбранному усилению. Записать спонтанную активность (2—3 с).

3. Этот пункт опыта выполняют, если используют вкусовые растворы, приготовленные на дистиллированной воде. Адаптировать рецепторы к дистиллированной воде (20—30 с орошения поверхности языка непосредственно перед предъявлением вкусового стимула). Записать на пленку «водный ответ» рецепторов в стадии адаптации (кадр—2—3 с).

4. Наполнить пипетку раствором исследуемого вещества в наименьшей концентрации. За 1—2 с до начала раздражения включить систему записи на пленку, быстро вылить вкусовой раствор на поверхность языка, начиная с корня, чтобы раствор стекал к его кончикам,

попадая на всю рецепторную поверхность. Записывать рецепторный ответ (3—4 с). Смыть раздражитель с языка раствором Рингера, покрыть нерв «увлажнителем» (фильтровальная бумага, пропитанная раствором Рингера).

5. Если использованный вкусовой раствор вызвал визуально заметный (по экрану осциллографа) ответ рецепторов, снизить концентрацию вещества и довести ее до подпороговой; если ответа не наблюдали, перейти к испытанию растворов более концентрированных — пока на экране осциллографа не будет заметно четкое повышение уровня импульсации в сравнении с фоном.

6. Найти описанным способом пороги для всех выбранных для опыта вкусовых стимуляторов.

Опыт 2. Выявление характерных особенностей импульсного ответа вкусовых рецепторов на вещества разного вкусового качества

Методика. Используют растворы веществ в надпороговых концентрациях: раствор NaCl 0,5—1 моль/л, раствор глюкозы 0,25—0,5 моль/л, раствор хинина 0,1—0,5 ммоль/л и водопроводную воду. В каждом конкретном случае концентрацию вещества подбирают индивидуально, сообразуясь с чувствительностью препарата.

Регистрацию ответа на сверхпороговую концентрацию вещества и водопроводную воду проводят таким образом: 1-ю запись делают так же, как на пороговый раздражитель (фаза начала ответа, длительность кадра — 4—5 с), последующие записи продолжительностью по 2 с делают на 10-й и 15-й с действия вещества. Такой порядок записи процесса позволяет уловить особенности развития во времени импульсного ответа на вещества разного вкусового качества («рисунок, образец разряда»): латентный период ответа¹, время достижения максимума разряда и его продолжительность, фазу устойчивого разряда, состав ответа по амплитуде импульсов, общую продолжительность ответа.

Ход работы. Порядок проведения этого опыта аналогичен предыдущему.

¹ Наряду со вкусовыми язык богато снабжен тактильными и температурными рецепторами, участвующими в комплексе со вкусовыми и обонятельными в распознавании пищевых и отвергаемых объектов. Проведение экспериментов на рецепторах одного вида, для чистоты картины, обычно требует исключения возбуждения других. В описываемых опытах температурные рецепторы практически не возбуждаются, так как применяемые растворы имеют комнатную температуру. Тактильные рецепторы возбуждаются в момент прикосновения струи раствора к поверхности языка. На экране осциллографа это отмечается «взрывом» более высокоамплитудных, чем «вкусовые», импульсов. Тактильные рецепторы быстро адаптируются, поэтому такой залп импульсов исчезает до появления «вкусового разряда», имеющего более продолжительный латентный период. Эту разницу в длительности латентных периодов можно использовать в данном опыте. В случае хорошо выраженного тактильного залпа приблизительно определяют латентный период ответа на вкусовые раздражители (от начала тактильного залпа до 1-го импульса вкусового разряда). При медленной подаче на язык вкусового раствора тактильный залп слабо выражен или сливается с началом ответа вкусовых рецепторов.

Опыт 3. Установление зависимости между интенсивностью вкусового стимула и величиной рецепторного ответа

Методика. Используют растворы стандартных вкусовых раздражителей в возрастающей концентрации: NaCl 0,1—1,5 моль/л, глюкозы 0,1—1,0 моль/л, солянокислого хинина 0,01—10 ммоль/л. Ответ регистрируют в виде импульсной активности в афферентном нерве и оценивают по частоте и числу импульсов, общей продолжительности импульсации.

В данном опыте не требуется точное определение порога раздражения, регистрируют ответ рецепторов на весь ряд растворов одного или нескольких вкусовых раздражителей и производят анализ результатов по пленке. Регистрацию рецепторного ответа осуществляют так же, как в предыдущих опытах на действие веществ в малых и средних дозах.

Ход работы. 1. Выбрать 1—3 вида вкусовых раздражителей, руководствуясь чувствительностью к ним препарата.

2. Включить отметку времени, записать калибровочный сигнал, повторив его в конце опыта.

3. Снять влажный тампон с языкоглоточного нерва и убедиться в отсутствии шунтирования биопотенциалов. Записать спонтанную активность (кадр — 3 с).

4. Адаптировать рецепторы к дистиллированной воде в течение 15—30 с. В конце этого процесса записать уровень ответа на воду (кадр — 2 с). Этот пункт выполняют, если использованы вкусовые вещества, растворенные в дистиллированной воде.

5. За 1—2 с до начала вкусовой стимуляции включить систему записи на пленку, быстро вылить вкусовой раствор из пипетки на корень языка и через 3—4 с выключить запись. Смыть раздражитель с языка раствором Рингера, закрыть нерв влажной фильтровальной бумагой.

6. Приготовить для опыта следующий в ряду концентраций раствор вкусового стимулятора. Зарегистрировать импульсный ответ, как описано в предыдущем пункте. Если ответ затягивается дольше 5—6 с, сделать записи также на 10-й и 15-й с действия вещества (каждый кадр — 2 с). Также регистрировать ответы вплоть до максимальных концентраций раствора. Соблюдать интервалы между раздражениями малыми дозами вещества (близкие к пороговым) в 1—1,5 мин, для более высоких — 2—3 мин.

7. Указанным способом записать ответы рецепторов на растворы веществ различного вкусового качества.

Опыт 4. Величина импульсной активности языкоглоточного нерва при вкусовой стимуляции различной рецепторной площади языка

Методика. Используют раздражитель любого вкусового качества средней интенсивности и водопроводную воду. (Этот опыт логически связан с предыдущим, поэтому при выборе учебного задания можно

рекомендовать выполнение обоих экспериментов.) Если работу начинают с данного опыта, необходимо предварительно определить силу действия того или иного раздражителя на всю рецепторную поверхность языка (предъявлением его из пипетки) и выбрать раствор надпороговой концентрации.

Ход работы. Поверхность языка делят на 3—4 участка разной площади, начиная от его кончиков. На них последовательно апплицируют раздражитель в виде полосок фильтровальной бумаги соответствующего размера, пропитанных исследуемым раствором. Чтобы раздражитель не попадал на соседние области языка, последний располагают на препаровальной ванночке с небольшим наклоном в сторону его кончиков. Перед аппликацией раздражителя поверхность языка слегка подсушивают фильтровальной бумагой; с «раздражающей» полоски бумаги стряхивают лишние капли раствора (рис. 110).

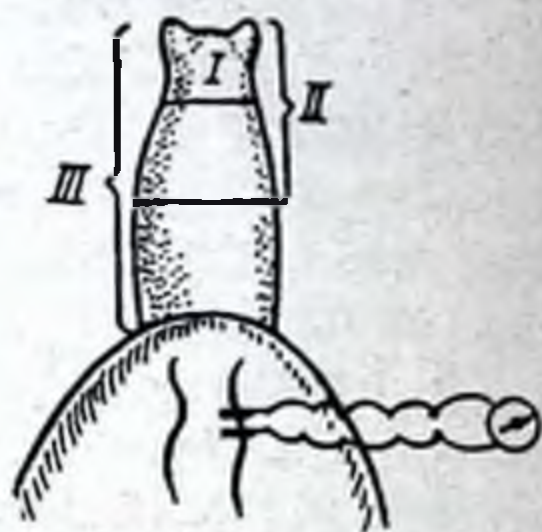


Рис. 110. Аппликация вкусового раздражителя на разную рецепторную площадь (I, II, III) языка лягушки

В конце (или начале) опыта проверяют уровень ответа на данный вкусовой раздражитель разных областей языка (корень, середина, края, кончики), апплицируя на них полоски бумаги равной площади. Регистрацию рецепторных ответов осуществляют так же, как в предыдущем опыте для растворов средней концентрации. Интервал между раздражениями — 2 мин.

Обработка результатов. Анализ результатов каждого опыта следует проводить по определенным участкам отснятой пленки, просматривая их с помощью специального прибора для чтения микрофильмов «Микрофот», фотоувеличителя или любого проекционного аппарата. Подсчет импульсов в ответе на каждый исследуемый вкусовой стимул производят на кадрах пленки, соответствующих 3—5 с записи; результаты выражают в числе импульсов/с или в общей сумме импульсов в ответе.

К опыту 1. Определяют пороговые концентрации вкусовых растворов, сравнивая частоту импульсов в ответе на них с уровнем предшествующей раздражению спонтанной активности. В опытах, где использовали вещества, растворенные в дистиллированной воде, частоту импульсов в ответе на раздражитель соотносят с уровнем импульсации, зарегистрированной в период адаптации к воде.

К опыту 2. Сравнивают характер импульсного ответа на разные вкусовые раздражители в его временном развитии: продолжительность латентного периода, время достижения максимума разряда и фазы устойчивого разряда, их длительность, общая продолжительность импульсного ответа. Определяют состав ответа по амплитуде импульсов и выражают данные в процентах к общему числу импульсов; строят гистограмму распределения импульсов по амплитуде.

К опыту 3. Строят графики зависимости частоты импульсов от интенсивности раздражителя для каждого исследуемого вещества. Подсчет импульсации ведут по отрезкам пленки, соответствующим заре-

гистрированным моментам ответа за одинаковые интервалы времени — 0,5 или 1,0 с. Для построения графиков берут как средние значения частоты импульсов за весь период ответа, так и отдельно частоту импульсов в различные фазы ответа. Определяют, какой зависимости подчиняются отношения интенсивность стимула — величина рецепторного ответа (доза — эффект) для разных по качеству вкусовых стимулов, не изменяется ли характер этой зависимости от концентрации вещества. Обращают внимание на амплитудный спектр ответов и его изменение при увеличении интенсивности стимула.

Результаты, полученные в этом опыте, могут быть также проанализированы с точки зрения особенностей временной структуры импульсных ответов на разнокачественные вкусовые стимулы: латентный период ответа, время развития и продолжительность разных фаз вкусового разряда, длительность всего ответа, его амплитудный спектр.

К опыту 4. Проводят подсчет импульсов в зарегистрированные моменты опыта способом, описанным выше (к опыту 3). Отмечают, как изменяется импульсный ответ языкоглоточного нерва по частоте и амплитуде импульсов при раздражении одним и тем же вкусовым раствором разной по величине рецепторной поверхности языка. Рассматривают данные опыта также с точки зрения топографии на языке лягушки рецепторов, чувствительных к определенному вкусовому качеству. С этой целью сравнивают уровень ответа на один и тот же вкусовой раствор разных участков языка при стимулировании равных их площадей¹.

Цель работы. Исследовать процесс развития адаптации вкусовых рецепторов к одному из адекватных раздражителей и сравнить его характер при использовании раздражителей разного вкусового качества. Определить зависимость скорости развития адаптации от интенсивности стимула.

З а д а ч а 2. Адаптация вкусовых рецепторов языка лягушки

Адаптация — характерное свойство рецепторов и сенсорных систем. Длительное действие раздражителя на рецепторы, органы чувств приводит к ослаблению ощущения или полному его исчезновению — адаптации; после прекращения стимуляции чувствительность со временем восстанавливается. Адаптация анализаторных систем — сложное явление, которое может возникать на разных этапах сенсорного пути: от периферических чувствительных образований до центрального представительства рецепции.

Периферическую рецепторную адаптацию регистрируют в электрофизиологических опытах как снижение частоты импульсов в афферентном нерве при длительном действии раздражителя на рецептор. Механизм ее недостаточно изучен. Видимо, существует возможность развития адаптации на любом участке формирования возбудительного процесса в рецепторе: на уровне взаимодействия стимула с чувствительной мембраной, на стадии образования генераторного потенциала, в период развития афферентного разряда, а во вторичных рецепторах — в фазу синаптической передачи возбуждения. Процессы,

¹ При наличии в учебной лаборатории интегратора и пересчетных устройств типа счетчика импульсов ПС-100 следует познакомить студентов с автоматической обработкой сигналов по частоте и интегративной регистрацией процесса.

лежащие в основе этого явления, очевидно, не однозначно протекают в разных рецепторных образованиях.

По скорости развития адаптации рецепторы делят на *быстро* и *медленно адаптирующиеся*. Быстро развивается адаптация (секунды, доли секунды) в кожных механорецепторах. Медленнее адаптируются хеморецепторы (десятки секунд и минуты); существуют практически *неадаптирующиеся* рецепторы — барорецепторы сосудов.

Биологическое значение адаптации, видимо, заключается в том, чтобы ограничить прохождение афферентного потока в центры, когда его информативная роль уже выполнена, а также в предохранении самих рецепторов от «нецелеобразной» нагрузки.

Вкусовые рецепторы относят к медленно адаптирующимся — на сверхпороговые раздражители адаптация развивается в них в течение секунд, десятков секунд и минут. Скорость наступления адаптации и продолжительность периода последующего восстановления рецепторной чувствительности связаны со свойствами раздражителя, его интенсивностью и временем контакта с рецептором.

Быстрая и медленная части афферентного разряда адаптируются и восстанавливаются с различной скоростью.

Для вкусового аппарата отмечено также явление «*перекрестной*» адаптации — длительное действие на рецептор одного вещества приводит к изменению уровня его реакции на другие раздражители той же или иной модальности. В зависимости от природы используемых агентов и продолжительности их действия наблюдают как усиление, так и ослабление ответа. Результаты исследований на рецепторном уровне немногочисленны, и убедительного объяснения механизма явлений нет: объясняют сходством структуры рецепторных участков мембраны для используемых веществ; допускают возможность химического видоизменения активного центра мембраны для тестового вещества в процессе адаптации к другому агенту; предполагают наличие эффекта экранизации активного центра адаптирующим веществом.

О п ы т 1. Исследование процесса развития адаптации вкусовых рецепторов к адекватному раздражителю

Методика. В качестве адаптирующего раздражителя используют раствор любого вкусового вещества в надпороговой дозе (0,5 — 1М раствор NaCl, 0,2—0,5 М раствор глюкозы, 0,1—0,5 мМ раствор хинина) или водопроводную воду. Критерием выбора раздражителя служит достаточно высокая чувствительность к нему рецепторов. Наличие такого ответа проверяют обычным способом — подачей вкусового раствора из пипетки на дорсальную поверхность языка.

Вкусовой раствор подают на язык медленной непрерывной струей или каплями из сосуда Мариотта (скорость вытекания раствора в ходе опыта поддерживают постоянной 0,1—0,4 мл/с). При этом необходимо свести к минимуму механическое раздражение языка вытекающей жидкостью, чтобы избежать маскировки вкусового ответа залпами импульсов тактильных рецепторов. Этого достигают, спуская жидкость на язык по ватному фитильку, прикрепленному к свободному концу резиновой трубки, связанной с сосудом Мариотта (рис. 111).

Вкусовую стимуляцию продолжают до тех пор, пока частота импульсов не снизится до 10—15% от исходного уровня ответа (контроль за развитием процесса в ходе опыта осуществляют визуально).

После развития адаптации добиваются восстановления исходной чувствительности рецепторов к адаптирующему стимулу. Для этого язык непрерывно омывают раствором Рингера из другого сосуда Ма-

риотта. Через определенные интервалы времени (2—3 мин) проверяют величину ответа на адаптирующий раствор предъявлением его из пипетки. Осциллограмма развития адаптации представлена на рис. 112.

Ход работы. 1. Проверить чувствительность рецепторов к основным вкусовым стимулам и водопроводной воде. Выбрать адаптирующий раздражитель и записать ответ на него в начальной фазе и в стадии устойчивого разряда (сразу после раздражения и через 10 с, длительность каждого кадра 2—3 с). Тщательно смыть раздражитель с языка раствором Рингера.

2. Заполнить один из сосудов Мариотта испытуемым раствором, другим раствором Рингера. Установить нужную скорость вытекания жидкости. Прикрепить к резиновой трубке, идущей от сосудов, ватный фитилек, свободный конец которого поместить на корень языка.

3. При использовании вкусовых раздражителей, приготовленных на дистиллированной воде, провести кратковременную адаптацию к ней (20—30 с), записать импульсную активность в стадии адаптации к воде (кадр 2—3 с).

4. За 1—2 с до начала адаптирующей вкусовой стимуляции включить запись на пленку. Пустить ток вкусового раствора на язык и зарегистрировать начальную фазу ответа (3—4 с). Далее проводить регистрацию вкусового ответа на 10, 20, 30-й с, 1, 3, 5, 7-й мин непрерыв-

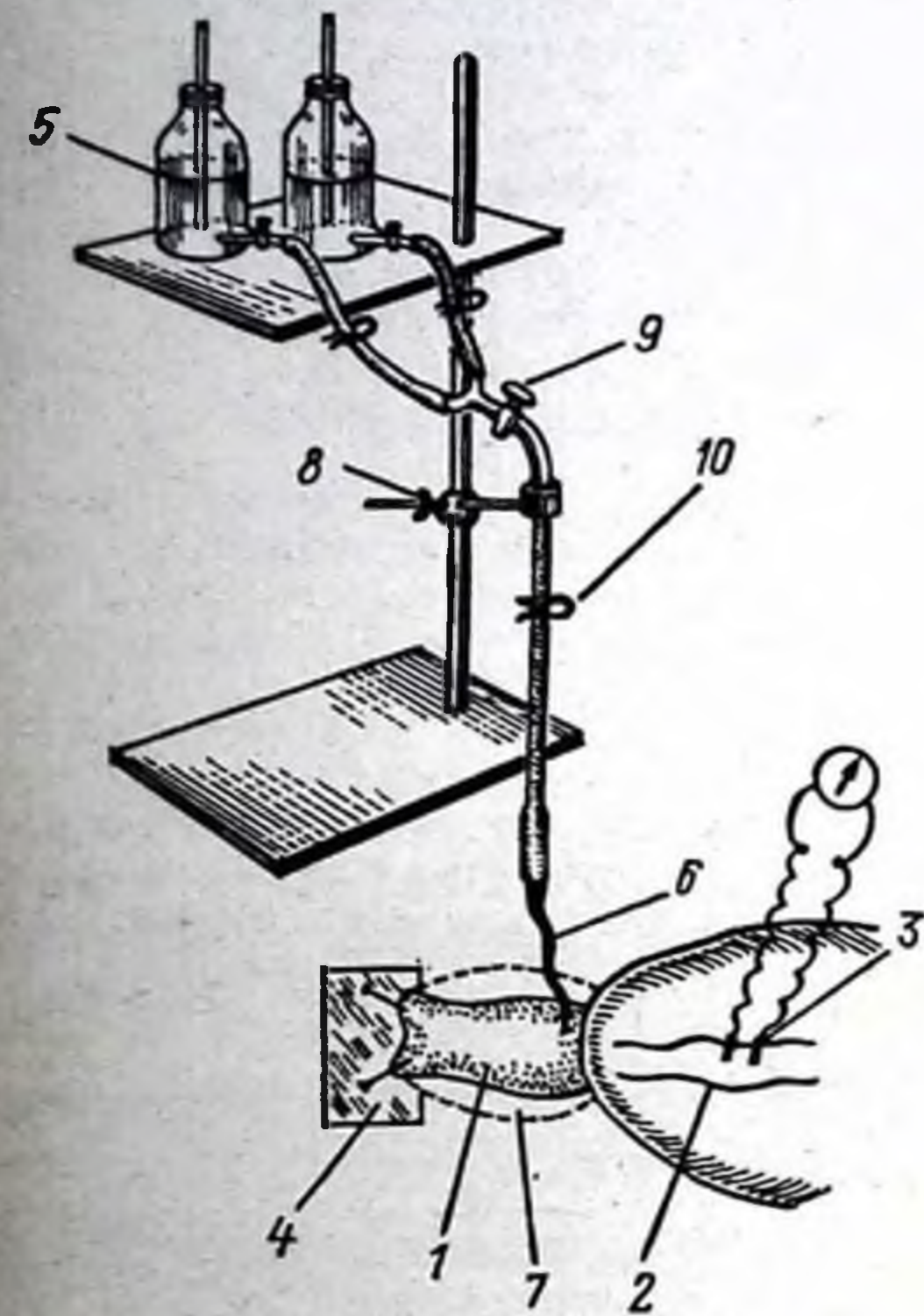
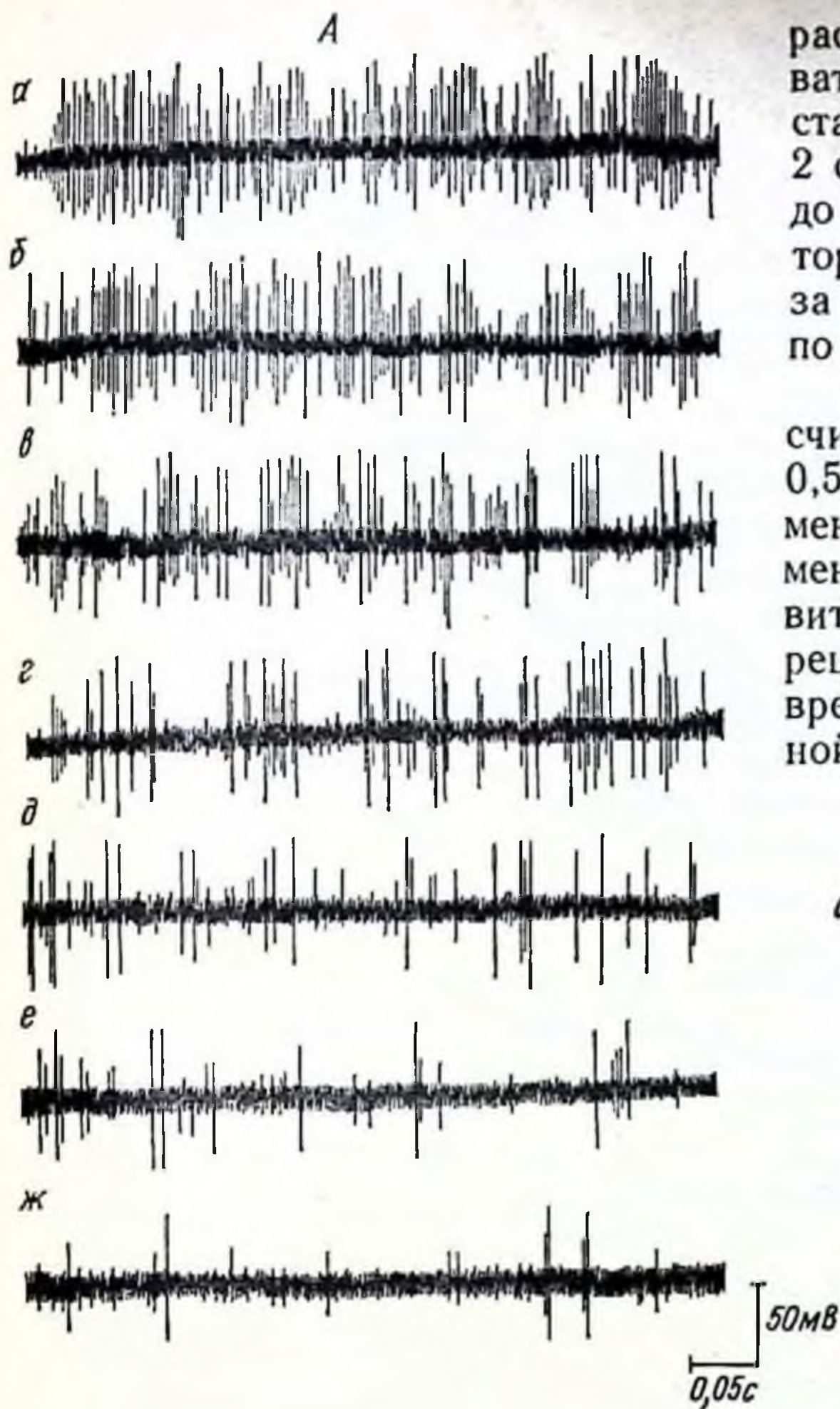


Рис. 111. Установка для проведения опытов по адаптации вкусовых рецепторов языка лягушки:

1 — дорсальная поверхность языка, 2 — языкоглоточный нерв, 3 — регистрирующие электроды, 4 — пробковая подставка для закрепления языка, 5 — сосуды Мариотта с вкусовым раствором и раствором Рингера, 6 — ватный фитилек, 7 — отверстие в ванночке для стока растворов, 8 — штамп, 9 — винтовой зажим (зажим Гоффмана), 10 — пружинный зажим (зажим Мора)

ной вкусовой стимуляции, а затем, если есть необходимость, — с 3-минутными интервалами (общая продолжительность стимуляции не должна превышать 12—15 мин); длительность каждого кадра — 2 с. Нерв увлажнять раствором Рингера (закрывать фильтровальной бумагой) каждые 1,5—2 мин.

5. Зарегистрировать процесс восстановления рецепторной чувствительности к адаптирующему стимулу: смывать раздражитель с языка раствором Рингера (из второго сосуда Мариотта), проверяя через каждые 2 мин величину импульсного ответа предъявлением вкусового



раствора из пипетки; регистрировать ответ в начальной фазе и в стадии устойчивого разряда (кадр—2 с). Такую процедуру проводить до полного восстановления рецепторной чувствительности (контроль за ходом процесса — визуальный, по экрану осциллографа).

Обработка результатов. Подсчитывают число импульсов за 0,5, 1-секундные интервалы времени в зарегистрированные моменты ответа. Строят график развития адаптации и восстановления рецепторной чувствительности во времени, отмечая уровень импульсной активности в стадии адаптации

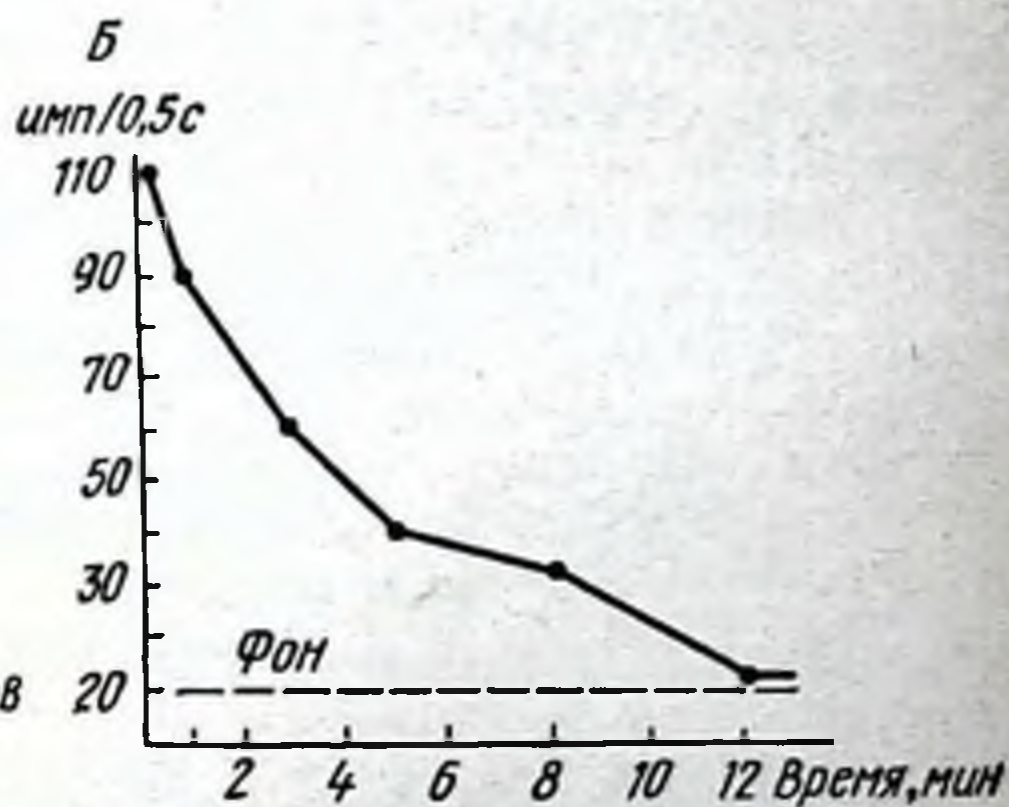


Рис. 112. Адаптация вкусовых рецепторов языка лягушки к 0,5М раствору NaCl. А — осциллограмма; Б — кривая развития адаптации рецепторов:

а — уровень афферентной импульсации в языкоглоточном нерве в первый момент орошения языка вкусовым раздражителем, б—е — то же, через 1, 3, 5, 8 и 12 мин соответственно после начала орошения, ж — уровень спонтанной активности

к раствору Рингера (или дистиллированной воде). Обращают внимание на скорость развития адаптации и восстановления различных фаз рецепторного ответа (быстрой, высокочастотной фазы начального разряда и стадии устойчивого разряда).

Опыт 2. Сравнение характера развития адаптации вкусовых рецепторов к веществам разного вкусового качества

Методика. См. предыдущий опыт. Используют вкусовые растворы разного качества средней стимулирующей силы и водопроводную воду. Перед экспериментом подбирают необходимые концентрации вкусовых

растворов, апплицируя их на язык из пипетки. Регистрируют начальную фазу рецепторного ответа и стадию устойчивого разряда (кадры — по 2—3 с).

Ход работы. Проводят исследование процесса адаптации и восстановления чувствительности к каждому из вкусовых веществ согласно описанию, приведенному для опыта 1 данной задачи.

Обработка результатов. Сравнивают характер развития процессов для различных вкусовых стимуляторов. Опытные данные выражают графически (см. предыдущий опыт).

Как расширенный вариант этого опыта можно предложить наблюдение явления «перекрестной» адаптации. На фоне адаптации, развившейся к одному вкусовому стимулу, проверяют реакцию рецепторов на другие раздражители того же вкусового качества и вещества, обладающие иным вкусом (например, при адаптации к NaCl — ответ на другие соли, на фоне адаптации к глюкозе — на сахарозу, а также ответы на NaCl, хинин, водопроводную воду и пр.). До начала адаптации записывают исходный ответ на все тестируемые раздражители. При этом тестирование на фоне развившейся адаптации проводят кратковременно (4—5 с), смывают вкусовые вещества с языка адаптирующим раствором, тем самым поддерживая постоянную глубину адаптации.

После проверки реакции на тестируемые раздражители добиваются восстановления чувствительности к адаптирующему веществу и на этом фоне снова проверяют реакцию на исследуемые стимулы.

Опыт 3. Развитие адаптации вкусовых рецепторов к раздражителям разной интенсивности (одного вкусового качества)

Методика. См. опыт 1. Используют для проведения эксперимента 2—3 градации силы раздражителя любого вкусового качества. Выбранные для опыта растворы должны значительно отличаться по силе действия на рецепторы.

Ход работы. 1. Записать в начале и конце опыта калибровочный сигнал.

2. Записать исходный ответ на исследуемые растворы в начальной фазе и в стадии устойчивого разряда (на 1 и 10 с действия вещества).

3. Исследовать адаптацию, начиная с наименьшей концентрации раздражителя.

4. Проверить на фоне развившейся адаптации величину реакции рецепторов на раствор более высокой концентрации.

5. Добиться восстановления исходной чувствительности рецепторов к адаптирующему раствору.

6. Перейти к изучению адаптации для более концентрированных растворов.

Обработка результатов. Обращают внимание на то, как изменяются характер, продолжительность, развития адаптации и ее глубина (время восстановления исходного уровня чувствительности) в зависимости

от концентрации используемого раствора; полученные данные представляют графически.

Цель работы. Показать существование для вкусового рецепторного аппарата процессов саморегуляции и исследовать характер его центральной регуляции.

З а д а ч а 3. Регуляция деятельности вкусовых рецепторов

Деятельность большинства рецепторов находится под контролем ЦНС. Влияния центров на рецепторную активность могут быть прямыми, направленными на сами рецепторы или их афферентные волокна, и опосредованными через изменение кровоснабжения рецепторов, свойств вспомогательных структур и окружающих тканей.

На активность большинства рецепторов ЦНС оказывает тоническое тормозное влияние. Наряду с этим центры осуществляют срочную, направленную регуляцию, характер которой (возбуждение, торможение) зависит от типа рецепторов и их взаимосвязей в организме. В составе каналов, передающих центробежные влияния, обнаружены симпатические волокна. Их действие на различные рецепторы не однозначно (повышение активности механорецепторов кожи, снижение реактивности вкусовых рецепторов), при этом часто симпатические влияния осуществляются сопряженно с воздействиями несимпатической природы.

В рецепторных приборах протекают также процессы саморегуляции, основанные на принципе взаимодействия единиц, анатомически связанных разветвлениями одного чувствующего волокна, т. е. в пределах рецепторного поля.

Центральная и периферическая регуляции призваны способствовать оптимальной настройке рецепторных аппаратов и сенсорных систем организма на восприятие адекватной стимуляции. Для вкусового рецептора установлено существование периферического взаимодействия, проявляющегося в снижении активности единиц, соседних с возбужденной (латеральное торможение), и центральной регуляции. Контролирующее влияние ЦНС имеет форму тонических тормозных воздействий и срочных рефлекторных реакций разного знака.

Тонические влияния в эксперименте обнаруживаются после пересечения нервных путей, связывающих рецепторы и центры, и проявляются в возрастании ответов рецепторов на адекватные раздражители. Основой рефлекторной регуляции является связь вкусовых рецепторов с другими рецепторами организма и в первую очередь с рецепторами пищеварительного тракта, а также взаимосвязь рецепторов самого вкусового аппарата, например рецепторов разных половин языка. Так, адаптация вкусовых рецепторов одной половины хронически расщепленного языка лягушки приводит к снижению чувствительности другой половины к тому же раздражителю. Угнетение ответов вкусовых рецепторов наблюдается также при раздражении центрального конца языкоглоточного нерва лягушки с контралатеральной стороны. Центральные тормозные влияния связаны с развитием гиперполяризации в рецепторных клетках.

Таким образом, в составе языкоглоточного нерва к вкусовому аппарату подходят как афферентные, так и эфферентные волокна.

Саморегуляция рецепторов проявляется в форме латерального торможения: сильная адекватная стимуляция одной группы вкусовых сосочков приводит к подавлению активности другой группы, находящейся в пределах того же рецептивного поля. Аналогичная картина наблюдается при раздражении периферического конца языкоглоточного нерва: на той же стороне (ипсилатерально) происходит торможение импульсного ответа на адекватную стимуляцию рецепторов. Низкие частоты антидромного раздражения нерва мало сказываются на активности рецепторов; увеличение частоты и общей продолжительности электрического раздражения усиливает эффект торможения (рис. 113). Этот эксперимент относительно прост в исполнении и ниже приводится его описание. Однако при разборе результатов следует учитывать, что такая форма постановки опыта включает в себе вероятность некоторой имитации центральных влияний на рецепторы. В более чистом виде процессы саморегуляции обнаруживаются

при раздражении с помощью микропипеток отдельных грибовидных сосочков.

Опыт 1. Исследование процессов саморегуляции во вкусовом рецепторном аппарате

Методика. См. «Общие методические указания». Кроме того, используют стимулятор типа «ЭСЛ-1» или «ЭСЛ-2».

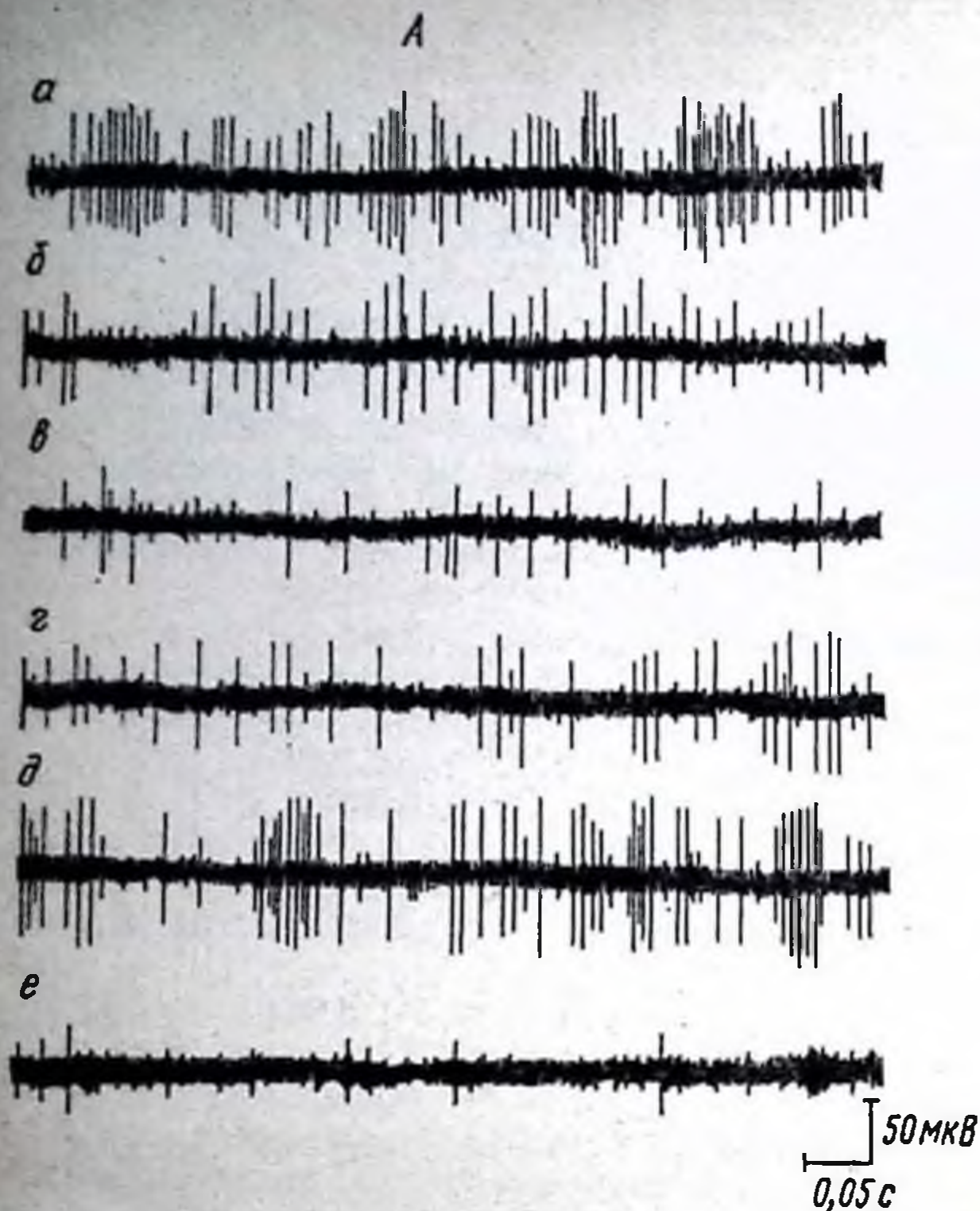
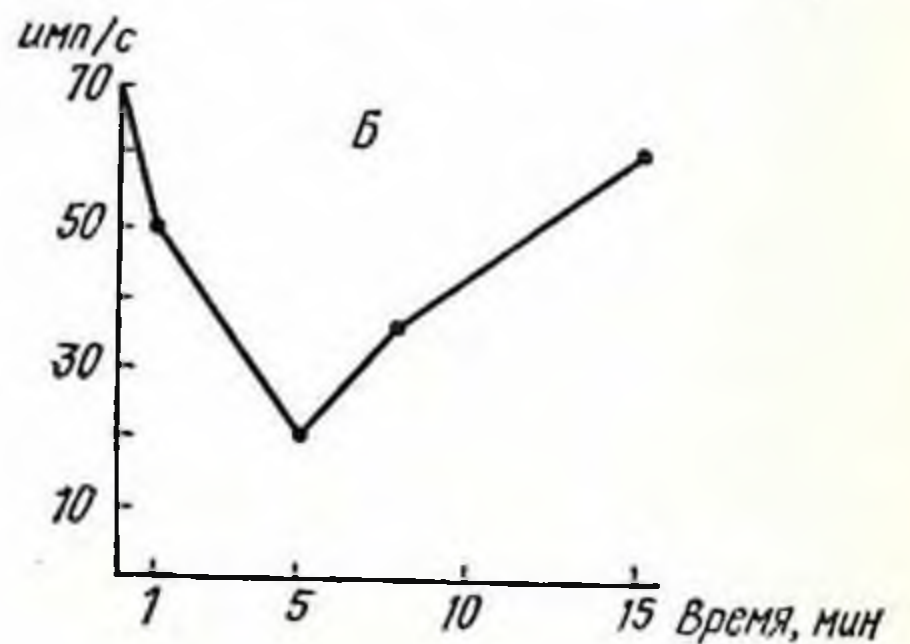


Рис. 113. Торможение активности вкусовых рецепторов языка лягушки (ответ на водопроводную воду) при электрическом раздражении периферического конца языкоглоточного нерва ипсилатеральной стороны. А — осциллограмма; Б — кривая развития эффекта торможения:

а — исходный ответ рецепторов на водопроводную воду, б — ответ рецепторов сразу после электростимуляции языкоглоточного нерва, в—г — ответы спустя 5, 8 и 15 мин соответственно после раздражения нерва, е — спонтанная активность

Опыт проводят на травяной лягушке с отпрепарированными языкоглоточными нервами, языком, извлеченным из ротовой полости и закрепленным на корковой пластинке препаровальной ванночки. Животное обездвиживают обычным путем, иногда с добавлением небольших доз миорелаксанта. Показателем активности рецепторов служит афферентная импульсация язычного (или языкоглоточного) нерва.

Ход работы. 1. Включить отметку времени. В начале и конце опыта записать калибровочный сигнал.

2. Зарегистрировать рецепторный ответ в начальной фазе и стадии устойчивого разряда на любой вкусовой стимул средней интенсивности или водопроводную воду. Включить запись за 2—3 с до начала стимуляции, на этом фоне из пипетки быстро нанести на всю дорсальную поверхность языка вкусовой раствор. Запись выключить через 3—4 с после начала раздражения; 2-ю запись продолжительностью 2 с сделать на 10-й с действия раздражителя. Вкусовой стимулятор смыть с языка раствором Рингера.

3. Произвести электрическое раздражение языкоглоточного нерва

электродами, служащими для регистрации рецепторного ответа, соединив их с клеммами выхода стимулятора. Параметры раздражения нерва: частота 40 Гц, длительность стимула 1—1,5 мс, амплитуда 2—5 В, продолжительность электростимуляции 15—30 с.

4. Сразу после окончания раздражения нерва соединить электроды с входом усилителя, используя их снова как отводящие. Записать ответ рецепторов на тестирующий вкусовой раздражитель сразу после электростимуляции нерва и через 2, 5, 10, 20 и 30 мин. Следить по экрану осциллографа за характером происходящих изменений в рецепторной активности. Последнюю запись сделать при полном восстановлении исходного уровня реакции рецепторов на вкусовой раздражитель.

5. Повторить опыт с применением большей частоты электростимуляции нерва 80—100 Гц, оставляя другие параметры раздражения прежними.

Обработка результатов. Подсчитывают импульсацию в отснятых отрезках пленки за 1-секундные интервалы. Отмечают изменение рецепторного ответа по частоте и амплитуде импульсов после антидромного раздражения языкоглоточного нерва. Данные выражают графически.

О п ы т 2. Исследование центральной регуляции вкусовых рецепторов

Методика. Наблюдают за изменением активности вкусовых рецепторов языка лягушки после раздражения центрального конца контралатерального языкоглоточного нерва; показателем активности рецепторов служит афферентная импульсация в ипсилатеральном языкоглоточном нерве. Опыт проводят на животном с сохраненным продолговатым мозгом или обездвиженном малыми дозами миорелаксанта — диплацина, тубокурарина и др. (0,1—0,2 мл). Препарируют нервы с двух сторон, один нерв перевязывают лигатурой и дистальнее перевязки перерезают, другой — оставляют интактным. Кроме обычной электрофизиологической аппаратуры, применяемой для регистрации импульсной активности, в опыте используют электростимулятор «ЭСЛ-1» или «ЭСЛ-2» и две пары серебряных биполярных электродов. Одна пара электродов служит для раздражения центрального конца перерезанного языкоглоточного нерва, другая — для регистрации импульсной активности в интактном нерве противоположной стороны.

Ход работы. 1. Записать на пленку начальный период ответа рецепторов и фазу устойчивого разряда на любой вкусовой раздражитель средней интенсивности с интактного языкоглоточного нерва, как описано в предыдущем опыте.

2. Произвести электрическое раздражение центрального конца перерезанного языкоглоточного нерва. Параметры раздражения: частота 50 Гц, длительность стимула 1—1,5 мс, амплитуда 2—5 В, продолжительность электростимуляции 20—30 с.

3. Регистрировать ответ рецепторов с интактного языкоглоточного нерва на тестируемый вкусовой стимул — сразу после электрического

раздражения нерва и через 2, 5, 10, 20 и 30 мин после раздражения. Последнюю запись сделать на фоне полного восстановления исходной величины рецепторного ответа.

4. Повторить опыт с более высокой частотой электростимуляции нерва (80—100 Гц), оставив другие параметры прежними.

Обработка результатов. Подсчитывают на пленке частоту импульсов в зарегистрированных кадрах, производят пересчет за 1-секундные интервалы времени. Оценивают характер изучаемых воздействий: скорость и глубину развития, продолжительность наблюдаемых эффектов. Обсуждают возможный механизм изучаемых явлений.

Рекомендуемая литература: [41] — гл. VIII, IX; [4]; [11] — с. 138—153; [23] — с. 60—75; [53] — ч. I, II; [56] — с. 121—176, 376—454.

ТЕМА II. ТАКТИЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Тактильными рецепторами называются кожные рецепторы, чувствительные к механической стимуляции — прикосновению, давлению, растяжению, вибрации. Они принадлежат к группе первичночувствующих рецепторов и имеют различную морфологию — свободные нервные окончания и инкапсулированные образования (тельца Пачини, Мейснера, диски Меркеля и др.).

Свободные нервные окончания лежат в поверхностном слое кожи и предназначены для восприятия легкого прикосновения, инкапсулированные залегают в более глубоких кожных слоях и служат для рецепции давления, растяжения.

Механическое раздражение складывается из двух компонентов: *динамической* (активной) фазы и *статической* (пассивной). Динамическая составляющая стимула проявляется во время его движения, статическая — в период его постоянного действия. Тактильные рецепторы различают по чувствительности к этим компонентам. Одни из них — *фазные* — наиболее чувствительны к изменению скорости движения стимула, другие — *статические* — способны отвечать в период неизменного действия стимула. Наиболее адекватной для обоих видов рецепторов является динамическая форма стимуляции, она возбуждает оба вида рецепторов.

Основным моментом в возбуждении фазных рецепторов является скорость деформации кожи. Ее пороговая величина достигается при определенной, «критической» крутизне нарастания стимула; величина механической нагрузки (амплитуда стимула) при этом оказывается весьма малой. Если крутизна нарастания ниже критической величины, любое увеличение амплитуды механического стимула не способно вызвать возбуждение фазных рецепторов. На пороговое раздражение фазные рецепторы отвечают лишь 1—2 импульсами, возрастание скорости деформации ведет к увеличению числа импульсов в ответе.

Оптимальный диапазон крутизны, в пределах которого существует зависимость между частотой разряда фазных рецепторов и скоростью нарастания стимула, составляет для холоднокровных животных от 0,8 до 15 мм/с. Увеличение амплитуды стимула при сверхпороговой его крутизне существенно не отражается на импульсном ответе рецептора. Статические рецепторы способны возбуждаться как активной, так и пассивной деформацией кожи, но во время активной фазы раздражения они дают разряд большей частоты. Увеличение амплитуды стимула, если превышает разностный порог, влечет за собой возрастание частоты импульсного ответа. Тот и другой тип рецепторов иннервированы миелинизированными волокнами группы А, но фазные — более толстыми из них. Скорость проведения в этой группе составляет у теплокровных 20—70 м/с, у холоднокровных 5—45 м/с.

Сравнение функциональных свойств этих рецепторов указывает на большее совершенство фазных: они высоко чувствительны, имеют более короткий латентный период, возбуждение от них передается с большей скоростью; у позвоноч-

ных животных фазные рецепторы преобладают. Хотя обе группы рецепторов можно отнести к быстро адаптирующимся, в фазных рецепторах адаптация развивается быстрее (доли секунды), так же быстро происходит и восстановление их чувствительности. Фазные рецепторы способны к восприятию вибрационного раздражения.

Среди статических рецепторов есть образования с разной скоростью адаптации — некоторые из них адаптируются за несколько секунд, даже десятков секунд (группа относительно медленно адаптирующихся тактильных рецепторов, расположенных в глубоких слоях кожи и возбуждаемых более сильным механическим стимулом). Оба вида кожной рецепции информируют организм о разных сторонах механического стимула: фазные — об изменении скорости деформации, статические — о величине и продолжительности раздражения. Между этими двумя группами можно обнаружить и промежуточные по свойствам формы тактильных рецепторов.

Важным моментом в функционировании любых рецепторов, в том числе и тактильных, является их организация в *рецептивные поля* (РП), т. е. совокупность рецепторных единиц, иннервируемых разветвлениями одного афферентного волокна. РП сложно организовано морфологически и функционально; его размеры и насыщенность рецепторами неодинаковы — встречаются большие и малые РП, причем большие обычно имеют меньшую плотность рецепторов и объединяют в основном медленно адаптирующиеся единицы (у земноводных эта закономерность не выражена).

Единицы, составляющие РП, имеют различные функциональные свойства — латентность, чувствительность, характер импульсного разряда. В центре РП обычно находятся наиболее чувствительные рецепторы с коротким латентным периодом и высокой частотой разряда — «ведущие» единицы поля, к периферии чувствительность единиц снижается.

Одновременная стимуляция двух рецепторов РП вызывает в афферентном волокне не суммарный ответ, а ответ рецептора с наибольшей частотой разряда. При стимуляции всего РП в нервном волокне регистрируется обычно ответ только «ведущей» единицы. В основе этого явления лежит латеральное торможение. При кратковременном раздражении одного рецептора соседние оказываются заторможенными в течение 200—300 мс, продолжительность и интенсивность торможения усиливаются при одновременной стимуляции нескольких рецепторов (до 3—4 мин) и распространяются на соседние РП. Интенсивность торможения снижается по мере удаления от точки стимуляции. Латеральное торможение способствует более рациональному функционированию рецепторов и предохраняет центры от сенсорной перегрузки.

РП могут перекрываться, что создает возможность дублирования информативных каналов и повышает надежность работы сенсорной системы. Информация об интенсивности раздражения в этом случае может быть передана не только за счет увеличения частоты импульсов в одном нервном волокне, но и путем вовлечения в активность других волокон.

Помимо периферической саморегуляции, деятельность тактильных рецепторов находится под постоянным контролем ЦНС, что выражается в форме тонического тормозного влияния и срочных рефлекторных реакций, облегчающих или угнетающих рецепторную активность. Одним из каналов регуляции служит симпатическая система, которая может оказывать влияние на величину афферентной импульсации, воздействуя на сами рецепторные образования, или путем изменения свойств вспомогательных аппаратов и уровня кровоснабжения рецепторов. Действие симпатической системы обычно продолжительно, что, видимо, обусловлено выделением адренергического медиатора.

Общепринято, что действующим фактором механического стимула является растяжение, а не давление. Чувствительный к раздражителю субстрат расположен в рецептивной мембране нервного окончания. Механический стимул вызывает деформацию механочувствительного субстрата, что ведет к увеличению ионной проводимости (преимущественно к ионам Na^+) и созданию рецепторного потенциала, который деполяризует регенеративную область нервного волокна (ближайший перехват Ранвье) и вызывает появление здесь нервного импульса.

Во вторичных механорецепторах (волосковые клетки акустико-латеральной системы) чувствительный субстрат расположен в специальной рецептирующей

клетке. Здесь возникает рецепторный потенциал, а деполяризация нервного окончания происходит за счет синаптических процессов передачи возбуждения от рецепторной клетки.

З а д а ч а 1. Исследование основных функциональных свойств тактильных рецепторов кожи лягушки

Цель работы. Выявить типы тактильных рецепторов кожи лягушки и определить зависимость между величиной механической нагрузки и их импульсной активностью. Сравнить скорость адаптации разных типов тактильных рецепторов.

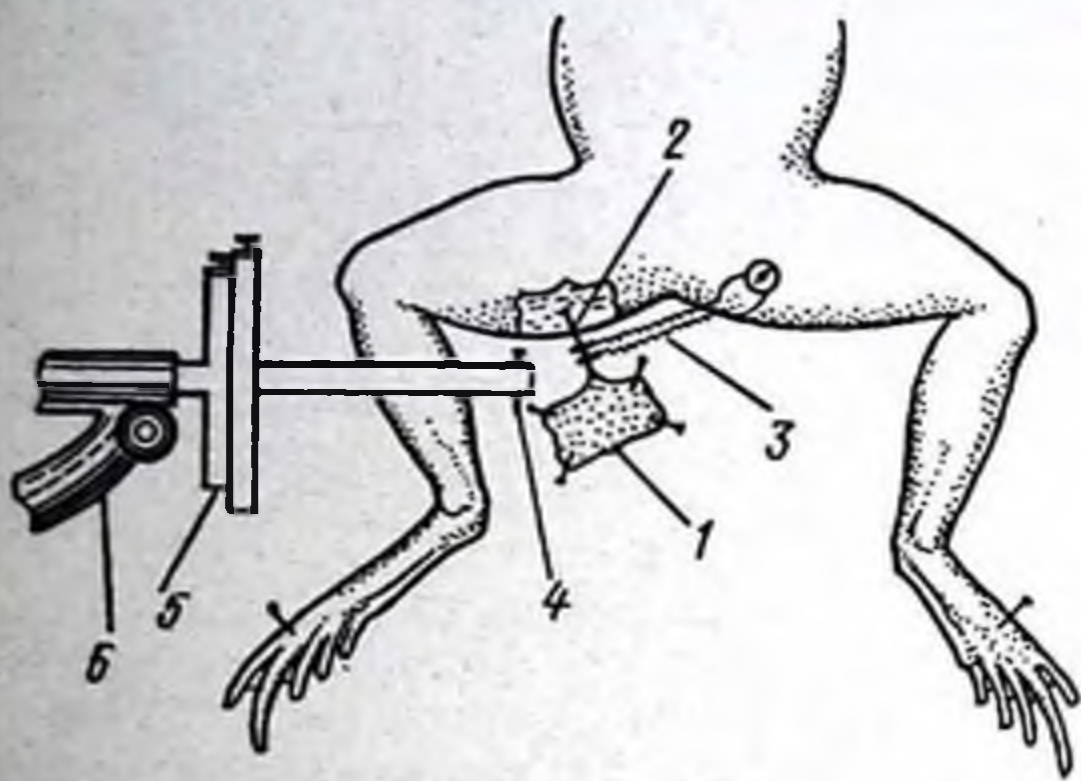


Рис. 114. Опыт по раздражению тактильных рецепторов кожи бедра лягушки:

1 — исследуемый участок кожи, 2 — кожная веточка бедренного нерва, 3 — регистрирующие электроды, 4—6 — датчик раздражения (4 — волосок Фрея, 5 — микроманипулятор, 6 — крепящая станина манипулятора)

Методика. В работе используют аппаратуру, необходимую для регистрации импульсной активности в нервных проводниках: УБП1-02 или УБП2-03, осциллограф С1-18, снабженный фоторегистрирующим устройством ФОР, Рекордина или др., или шлейфовый осциллограф МПО-2 или Н-102, при работе с которым применяют вибраторы 1, 1,5. Для визуальных наблюдений процесса используют электронно-лучевой осциллограф С1-19, С1-20 и др. Регистрацию аф-

ферентной активности в нерве проводят с помощью биполярных серебряных электродов диаметром 0,3—0,5 мм с межэлектродным расстоянием 2—3 мм. Скорость записи процесса 50—100 мм/с; полоса пропускания на усилителе 300—10 000 Гц; приблизительная величина усиления 10—15 мм = 50 мкВ.

Механическую стимуляцию рецепторов осуществляют точечным способом, используя набор «волосков Фрея» разной массы (5—400 мг). Волосок опускают на рецепторную поверхность с помощью специального подающего устройства — препаратоводителя, закрепленного в станине микроскопа. На препаратоводителе фиксируют плексигласовую линейку (длина 12—18 см, ширина около 2 см, толщина 0,5—0,7 см) (рис. 114). Выносной конец линейки имеет отверстие, в котором может свободно перемещаться волосок в вертикальном направлении. Набор волосков разной массы можно приготовить следующим образом. Нейлоновые упругие нити равного диаметра помещают в «футляр», сделанный из инъекционных игл. Концы иглы обрезают, к одному из них припаивают оловянную головку нужной массы, из другого конца должна слегка выступать нейлоновая нить.

В опыте необходимы большие и глазные ножницы, два тонких анатомических пинцета, тонкие острые стеклянные крючки, раствор Рин-

гера для холоднокровных, вата, марля, фильтровальная бумага, препаровальная ванночка, залитая воском вровень с краями; кинопленка высокой чувствительности, не менее 180 ед. (марки «А-2», «КН-4», «РФ»); контрастный проявитель и фиксаж для пленки, фотобачок большого размера или коррекс для проявления пленки. Эксперименты проводят в экранированной камере, животное и приборы заземляют.

Объект исследования — травяная лягушка, обездвиженная разрушением ЦНС или подкожной инъекцией 0,3—0,4 мл миорелаксанта (диплацин, тубокурарин, флакседил и др.). Изучают свойства механорецепторов участка кожи, покрывающего вентромедиальную поверхность бедра. Выбранный участок кожи иннервируется срединной кожной ветвью заднего бедренного нерва (X пара спинно-мозговых нервов). В составе кожной веточки проходят афферентные тактильные волокна разного диаметра (7—15 мм) со скоростью проведения от 3 до 33 м/с и тонкие эфферентные волокна симпатической природы (скорость проведения 3—6 м/с). На медиальной части бедра выкраивают небольшой участок кожи (100—200 мм²): отрезают его с трех сторон — вентральной, медиальной и латеральной, оставляя связь с кожей бедра по дорсальной стороне. Вырезанный лоскут расправляют на препаровальной ванночке внутренней поверхностью наружу и фиксируют булавками за края рядом с бедром животного. При этом стараются не натягивать сам кожный лоскут и особенно подходящий к нему со стороны бедра нервный ствол.

Препаровку нерва производят вблизи его выхода из бедра. К изучаемой области кожи нерв подходит в виде очень тонкой веточки, окруженной соединительной тканью и сосудами. Во избежание подсыхания всю область препаровки периодически орошают раствором Рингера. Срезают соединительнотканную пленку вокруг сосудисто-нервного пучка, стеклянными крючками отделяют сосуды от нерва и отводят их в стороны или перерезают. После препаровки нерва кожный лоскут полностью изолируют от бедра и переворачивают рецепторной (наружной) поверхностью вверх; осторожно, не натягивая нервную веточку, расправляют лоскут и за края фиксируют булавками вблизи бедра, не растягивая (рис. 114). Кожный участок заливают тонким слоем раствора Рингера, а отпрепарированный нерв покрывают тампоном ваты, смоченным в растворе Рингера для предохранения от высыхания.

В нерастянутых кожных препаратах с интактным нервом не наблюдается спонтанной активности, что соответствует нормальному физиологическому состоянию рецепторов без механического раздражения.

Поверхность выбранного для опыта участка кожи покрыта множеством пигментированных бугорков — «осязательных пятен», обладающих высокой чувствительностью к механическому раздражению. К бугоркам подходят афферентные волокна, концевые разветвления которых снабжены особыми дисками, специализированными для рецепции механического вида стимуляции.

В эксперименте производят точечную механическую стимуляцию осязательных бугорков волосками Фрея разной массы (от 5 до 400 мг).

Кончик волоска с помощью микроманипулятора устанавливают над избранной рецепторной точкой так, чтобы он касался поверхности жидкости, покрывающей кожный лоскут. Это обеспечивает постоянство расстояния между раздражающим кончиком волоска и осязательным бугорком. Прикосновение волоска к кожной поверхности производят быстрым поворотом винта микроманипулятора на определенное число делений (длительность раздражения 2—3 с), после чего нить возвращают в исходное положение быстрым поворотом винта в обратную сторону.

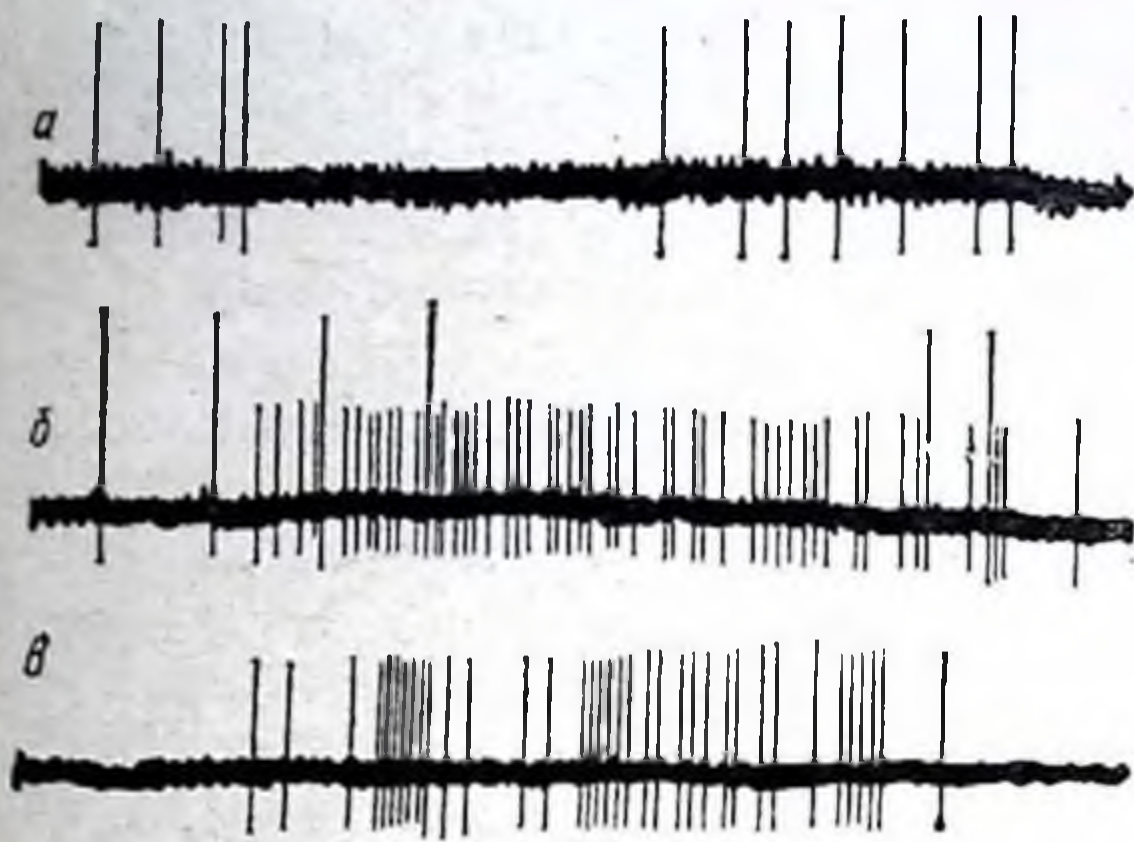


Рис. 115. Импульсные ответы различных типов тактильных рецепторов кожи лягушки на механическое раздражение:
а — фазный рецептор, б — фазный и статический, в — статический рецептор

Перед началом опыта проверяют функциональную целостность препарата. Для этого слегка касаются кожной поверхности кисточкой или стеклянным крючком и отмечают на экране осциллографа появление залпа высокоамплитудных импульсов. Ответ рецепторов регистрируют на пленке, подбирая необходимое усиление, яркость и четкость луча осциллографа, скорость записи процесса.

Амплитуда импульсов ниже 50—70 мкВ недопустима; низкая амплитуда может явиться следствием плохого состояния препарата (подсыхание, повреждение или натяжение рецепторной поверхности или нерва) или результатом шунтирования.

Работу начинают с раздражения минимальной амплитудой механического стимула выбранной рецепторной точки. Если раздражитель достиг пороговой величины, в афферентном нерве удастся зарегистрировать активность нескольких или одного нервного волокна. Ответ возникает чаще всего в начале и иногда в конце раздражения и представляет собой кратковременный разряд, состоящий из 1—3 высокоамплитудных импульсов (до 100—120 мкВ) с коротким латентным периодом и высокой скоростью адаптации. Такой тип импульсного ответа свидетельствует о возбуждении рецептора (ов) фазного типа (рис. 115, а; рис. 116, А).

При увеличении механической нагрузки (амплитуда стимула) обнаруживают в рецепторном участке единицы, реагирующие по типу статических рецепторов, т. е. не только в момент начала и конца раздражения, но и в период постоянного действия стимула. Наиболь-

шую частоту разряда регистрируют обычно в начале раздражения, затем постепенно происходит урежение импульсации. Адаптация такого разряда наступает значительно медленнее, чем фазного; амплитуда импульсов в разряде порядка 70—90 мкВ, длительность разряда — 1 с и более (см. рис. 116, В).

Часто обнаруживаются рецепторные точки, раздражение которых вызывает разряд нервных волокон различного типа. Он состоит из вы-

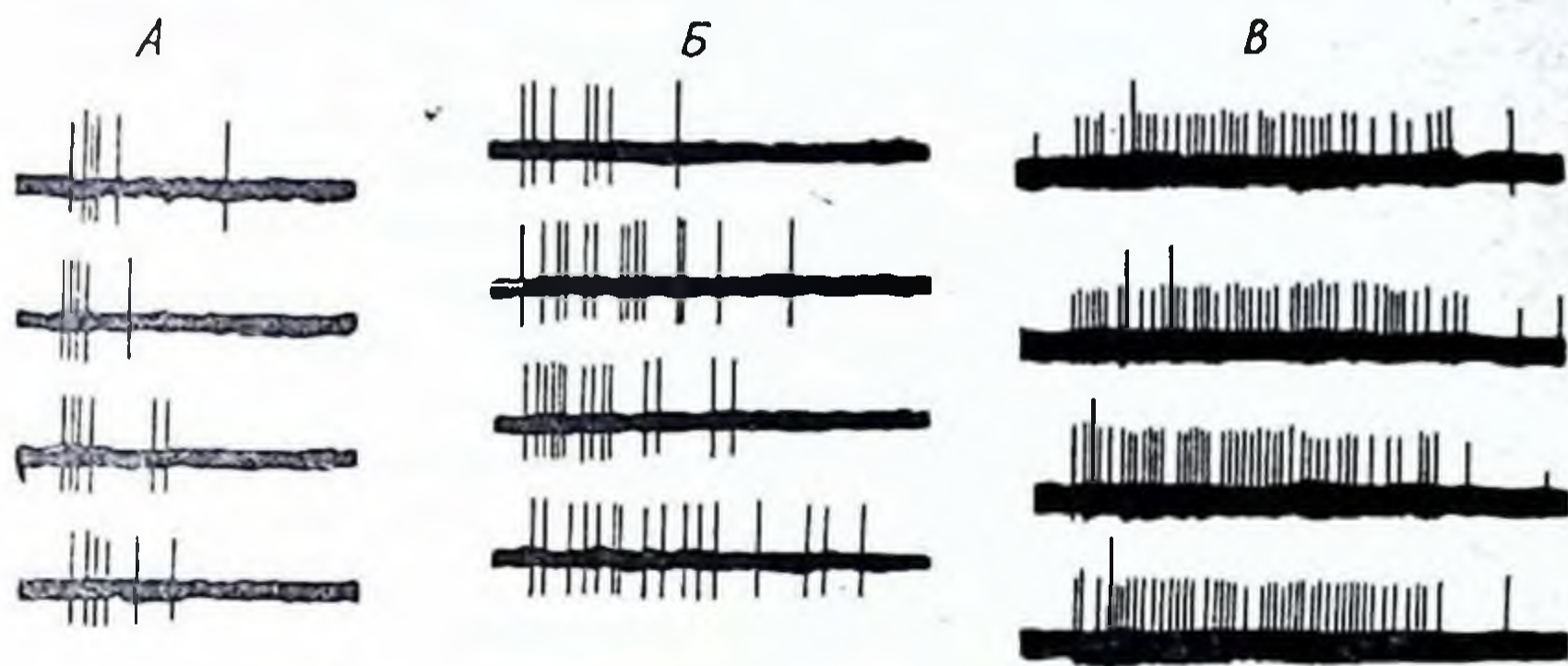


Рис. 116. Ответ тактильных рецепторов кожи лягушки (область бедра) при механической нагрузке 0,008 г (А), 0,01 г (Б) и 0,04 г (В)

сокоамплитудных импульсов в начале и конце механического раздражения, принадлежащих быстро адаптирующимся фазным рецепторам, и относительно низкоамплитудных, вызванных возбуждением рецепторов статического типа (рис. 115, б, рис. 116, В). Дальнейшее увеличение амплитуды стимула приводит в этом случае к возрастанию ответа статических рецепторов, мало меняя ответ фазных.

Применение еще более высокой интенсивности раздражения дает возможность выявить статические рецепторы с медленно развивающейся адаптацией. Они располагаются в глубоких слоях кожи, поэтому при легких деформациях не возбуждаются: разряд таких рецепторов носит довольно регулярный характер, с постепенным урежением импульсации к концу раздражения и длится в течение нескольких секунд.

Визуальные наблюдения импульсного разряда на экране осциллографа, как правило, не дают возможности определить тип реагирующих рецепторов, так как ответ продолжается весьма короткое время. Поэтому даже предварительный анализ результатов следует проводить по пленке.

Рекомендуется, записав ответ 1—2 чувствительных точек на весь ряд нагрузок, проявить пленку и провести предварительный анализ данных. Если рисунок импульсного разряда соответствует реакции только одного типа механорецепторов, опыт следует повторить на другой точке кожи. Необходимо учитывать, что интервал между раздражениями должен быть не менее 1—2 мин, в противном случае может наступить утомление рецепторов, значительно меняющее характер их реакции, или рецепторы перестают отвечать на стимуляцию.

При регистрации импульсных ответов афферентного нерва следует иметь в виду его необычайную тонкость и возможность быстрого подсыхания. Показателем последнего служит сначала увеличение амплитуды импульсов, а затем возрастание их длительности и превращение в монофазные. Во избежание этого нерв нужно смачивать раствором Рингера каждую минуту. Перед регистрацией процесса этот шунт тщательно удаляют фильтровальной бумагой (в длительном опыте используют вазелиновое масло, тонким слоем покрывающее нерв).

Ход работы. 1. Установить необходимые параметры регистрации процесса: яркость и резкость луча осциллографа, скорость протяжки пленки, величину усиления. Включить отметку времени. Записать калибровочный сигнал (повторить запись в конце опыта).

2. Проверить пригодность препарата для проведения эксперимента: быстро и легко коснуться 1—2 раза тонким кончиком стеклянного крючка или кисточкой поверхности кожного лоскута, касание должно сопровождаться короткими залпами высокоамплитудных импульсов, хорошо заметных на экране осциллографа. Пробную стимуляцию повторяют с записью на пленку (кадр 1—2 с). Для выбора подходящей скорости регистрации процесса ответ записывают при 3—4 различных скоростях движения пленки (25—100 мм/с). Препарат, пригодный для проведения опыта, должен чутко реагировать на слабое прикосновение, вне раздражения — не обнаруживать никакой спонтанной активности.

3. Приступить к опыту, установив датчик раздражения с волоском Фрея наименьшей массы (5—10 мг) над одним из осязательных бугорков. Залить поверхность кожного лоскута тонким слоем раствора Рингера. С помощью микровинта датчика раздражения плавно опустить волосок до соприкосновения его кончика с поверхностью жидкости.

4. Включив систему регистрации за 1—2 с до механической стимуляции, с помощью микровинта установки (вертикальная подача) очень быстро опустить волосок на поверхность осязательного бугорка, оставить на нем в течение 1—2 с и быстро поднять. Запись выключить через 1—2 с после этого (общая продолжительность кадра 4—6 с). Одновременно следить по экрану осциллографа за характером возникающего ответа.

Если раздражение не вызвало ответа, возможно, волосок не попал на рецепторную точку или масса волоска оказалась ниже пороговой величины. В этом случае через 1—2 мин следует повторить раздражение тем же волоском. При отсутствии ответа на повторное раздражение увеличить амплитуду стимула (до 15—30 мг). Если и в этом случае ответ отсутствует, сменить точку раздражения, оставив данную нагрузку. Если испытание нескольких точек окажется неэффективным, заменить препарат (предварительно допускается испытание нагрузки до 30—50 мг).

5. При заметной реакции рецепторов на малую амплитуду стимула продолжить опыт на данной точке, постепенно увеличивая силу раздражения. С возрастанием амплитуды механического стимула интервал между раздражениями следует увеличить до 3 мин. Иногда в ходе опыта стимуляция средней амплитуды может случайно не вызвать ответа

вследствие смещения волоска с рецепторной точки. Тогда повторить раздражение данным волоском, скорректировав его опускание на кожную поверхность. В ряде случаев отсутствие ответа или ослабление рецепторной реакции есть следствие утомления рецепторов и служит сигналом к увеличению интервала между стимулами.

6. Проверить действие всего ряда механических нагрузок еще на 2—3 осязательных бугорках для сравнения данных, включающих ответы тактильных рецепторов разных типов.

В качестве дополнительного задания проверить реакцию рецепторов на подачу раздражителя (средней амплитуды) с различной скоростью (скорость подачи стимула можно менять от руки)¹.

Обработка результатов. 1. По характеру импульсного ответа определяют тип тактильных рецепторов. 2. Отмечают изменение ответа тех или иных рецепторов на увеличение механической нагрузки: производят в каждом опыте подсчет импульсов за 1 с и весь период ответа, определяют амплитуду импульсов по калибровочному сигналу. В случае отсутствия отметки времени расчет ведут по скорости движения пленки. 3. Обсуждают вопрос о возможной природе афферентных проводников исследуемых рецепторов. 4. Сравнивают чувствительность и характер импульсного ответа рецепторов, расположенных в разных участках кожного лоскута.

Задача 2. Флуктуации чувствительности тактильных рецепторов

Точный анализ результатов, получаемых в опытах на рецепторных единицах или небольших их группах, требует знания явления флуктуации порога чувствительности. Известно, что порог раздражения различных рецепторов не является величиной строго постоянной, а испытывает некоторые колебания во времени. На кожных рецепторах холонокровных и теплокровных животных показано, что флуктуации порога (или уровня ответа на пороговый и слабо надпороговый стимул) могут быть весьма заметными. Для правильной оценки экспериментальных данных необходимо учитывать этот феномен. Он обнаруживается как на рецепторах, функционально связанных с центральной нервной системой, так и в изоляции от нее. Амплитуда колебаний пороговых ответов сглаживается под воздействием центров. Биологическую целесообразность этого явления видят в возможности оптимальной настройки рецепторного аппарата на восприятие адекватного стимула. Причины и механизм флуктуаций связывают с изменением внутреннего состояния самих рецепторных образований: флуктуации отражают нормальные процессы, протекающие в рецепторной мембране (меняющаяся мозаика возбужденных и невозбужденных участков) и в регенеративной области нервного волокна.

¹ Если приготовление описанного выше кожно-нервного препарата и работа с ним вызывают у студентов некоторые трудности (тонкий нервный ствол, сложно отделяемый без повреждения от подлежащих тканей и сосудов, быстрое подсыхание в ходе опыта и т. д.), можно рекомендовать проведение аналогичных опытов на кожном препарате, выделенном со спинной стороны у лягушки. Эти участки кожи хорошо иннервированы, нервные стволы несколько толще. Способы препаровки — такие же, как указано в методической части задачи. Следует проверить отведение от одного из нервных стволов, предварительно перевязав его у места выхода из тканей тонкой лигатурой; препарат полностью изолируют из организма и помещают на восковую ванночку, участок кожи закрепляют по краям булавками без натяжения и покрывают слоем раствора Рингера.

Цель работы. Проследить за величиной ответа механорецепторов кожи лягушки на пороговый и надпороговый раздражитель, выявить возможные колебания ответа во времени.

Методика. Препаровку, приборы, материалы, регистрацию процесса см. в задаче 1. Задачу проводят в 2-х вариантах: на животном с разрушенной нервной системой и животном, у которого рецепторы сохраняют функциональную связь с центрами (обезболивание миорелаксантом: вводят подкожно, в область нижних лимфатических мешков 0,2—0,4 мл диплацина или тубокурарина).

Ход работы. 1. Выбрать на поверхности выкроенного кожного лоскута бедра лягушки достаточно чувствительную рецепторную точку и определить порог раздражения. 2. Зарегистрировать рецепторный ответ на пороговый стимул 8—12 раз с интервалом 2—4 мин (не допускать утомления рецепторов). То же повторить для слабо надпорогового и средней амплитуды стимула.

Обработка результатов. По отснятым кадрам пленки определяют продолжительность импульсного разряда, частоту и число импульсов в нем для каждого из использованных стимулов. Устанавливают диапазон колебаний величины ответа рецепторов на пороговый и надпороговый раздражители.

Раздел V

ФИЗИОЛОГИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ

Данный раздел практикума содержит ряд задач, позволяющих студентам познакомиться с современными методическими приемами и получить экспериментальный материал, иллюстрирующий некоторые основные представления о функционировании сердечно-сосудистой и лимфатической систем. Кроме того, этот раздел преследует другую, не менее важную цель — научить молодых специалистов комплексному подходу к изучению физиологической проблемы, организации системного исследования. Так, например, разносторонне изучается проблема нервной регуляции сердца. Сердце рассматривают как автоматическую, саморегулирующуюся систему, основная функция которой — обеспечение гемодинамических потребностей всего организма. В соответствии с этим исследования проводят на клеточном, органном и организменном уровнях.

При выполнении тем I и III студенты знакомятся с основами электрофизиологии сердца, механизмами генерации автоматического ритма сердца и ролью проводящей системы как структуры, обеспечивающей организацию синхронного сердечного цикла. Параллельно они осваивают метод электрокардиографии как способ изучения процесса распространения возбуждения в сердце, получают представление о механизмах формирования полифазной ЭКГ, о ее нормативах у человека, а также знакомятся с клиническим значением и диагностическими возможностями данного метода.

Тема V знакомит студентов с принципиально новым явлением, еще не нашедшим широкого отражения в учебниках и руководствах по физиологии: с явлением внутриорганный рефлексорной регуляции деятельности сердца. Выполнение задач этой темы позволяет убедиться в том, что в сердце, лишенном связей с ЦНС, возможно протекание периферических вегетативных рефлексов, замыкающихся на уровне внутрисердечного ганглиозно-синаптического аппарата. Предлагаемые литературные источники дают представление о функциональной роли этого механизма в регуляции сердца и его соотношениях с механизмами центральной регуляции.

В теме IV использован метод регистрации механограммы сердца на кимографе, с помощью которого исследуют влияние на сердце экстракардиальных парасимпатических и симпатических путей и выявляют зависимость хронотропных и инотропных эффектов на сердце от параметров стимуляции нервных аппаратов. Помимо этого, исследуют импульсную активность в постганглионарных путях внутрисердечной нервной системы в условиях активации экстракардиальных нервных элементов, на основании чего проводят анализ участия внутрисердечного ганглиозного аппарата в формировании конечного импульсного воздействия на эффекторные структуры сердца.

В теме VI воспроизводят классические опыты О. Леви, положившие начало современной медиаторной теории, убеждаясь, что в ходе развития симпатических и парасимпатических эффектов в перфузате сердца появляются физиологически активные вещества, оказывающие на сердце-реципиент эффект, сходный с эффектом от раздражения соответствующего нерва, т. е. наблюдая явление «гуморального переноса».

В темах VII—IX изучают механизмы центральной рефлексорной регуляции сердца. В ходе их выполнения студенты осваивают методы регистрации биоэлектрической активности в нервных путях, знакомятся с особенностями организации и проведения электрофизиологического исследования применительно к проблемам кардиологии.

В темах X и XI студенты приобретают навык работы с теплокровными животными. В условиях острого опыта они изучают первые и гуморальные влияния на частоту сердцебиений и артериальное давление, применяют метод стереотаксического введения электродов в мозг кошки. В связи с тем, что в условиях острого эксперимента наркотизация животного в значительной мере видоизменяет центральные механизмы регуляции, студенты знакомятся с методом изучения сердечно-сосудистого контроля на ненаркотизированных необездвиженных животных.

ТЕМА I. ПРОВЕДЕНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ В СЕРДЦЕ

В сердцах, обладающих автоматической ритмикой, возбуждение возникает в специфических структурах миокарда, составляющих *водитель ритма сердца*, или *пейсмекер*. Пейсмекерная область имеет относительно небольшие размеры и строгую локализацию. В сердце теплокровных животных водитель ритма расположен в правом предсердии, в сердце лягушки — в венозном синусе. От пейсмекера возбуждение распространяется к миокардиальным структурам предсердий и желудочков, которые вовлекаются в возбуждение в строго определенной последовательности.

Такая строго определенная временная последовательность охвата возбуждением миокардиальных структур сердца обуславливается наличием в нем *проводящей системы*. Мышечные элементы, составляющие проводящие пути сердца, отличаются высокой скоростью распространения возбуждения. Свойством проводимости обладает и рабочий миокард, но возбуждение в нем распространяется значительно медленнее. Поэтому в норме, при целостности проводящей системы, возбуждение от водителя ритма распространяется по проводящей системе до конечных ее разветвлений и только на конечном этапе имеет место собственно миокардиальное проведение.

Проводящая система желудочков у теплокровных животных развита очень хорошо. Она представлена *атриовентрикулярным (а-в) узлом*, *пучком Гиса*, *ножками пучка Гиса* и широкой сетью конечных разветвлений, состоящих из *волокон Пуркине*. В желудочке сердца лягушки проводящая система менее развита, однако и здесь хорошо выражена головная часть проводящей системы в виде а-в воронки. Проводящая система предсердий не сливается с проводящей системой а-в узла и непосредственно не возбуждает ее. Активация структур а-в узла (или а-в воронки) осуществляется за счет стимуляторного воздействия совокупности миокардиальных элементов предсердий, контактирующих с клетками головной части проводящей системы желудочков.

При переходе возбуждения от мышечных волокон предсердий к клеткам а-в узла происходит задержка проведения. Она составляет значительную часть а-в паузы. 2-я часть а-в паузы обусловлена медленным проведением в структурах а-в узла. Время а-в проведения измеряют обычно электрокардиографическим способом — по длительности $P-Q(R)$ -интервала. Этот интервал включает и время, в течение которого возбуждение охватывает миокард предсердий; оно составляет примерно 0,06 с, таким образом, а-в задержка для сердца человека длится 0,12 с. В сердцах различных животных а-в пауза различна; так, в сердце лягушки она более длительна.

Наличие а-в паузы имеет важное физиологическое значение для обеспечения согласованной работы отделов сердца: в течение этого времени происходит заполнение желудочков кровью, выбрасываемой предсердиями. Механизм формирования а-в паузы до настоящего времени окончательно не выяснен. Согласно представлениям М. Г. Удельнова а-в соединение, область контакта мышечных элементов предсердий с головной частью проводящей системы желудочков, следует рассматривать как своеобразный *функциональный синапс*. Для него характерно наличие задержки и ориентированность проведения возбуждения. В норме через а-в область возбуждение распространяется только в направлении *от предсердий к желудочкам*; ретроградное распространение возбуждения проявляется только при некоторых патологических состояниях, например при нарушении автоматии синусного водителя ритма.

В а-в области возбуждение возникает заново в результате суммации ряда стимуляторных воздействий со стороны предсердных элементов, каждое из кото-

рых вызывает лишь местную деполяризацию. Время суммации, в течение которого достигается критический уровень деполяризации для возникновения распространяющегося ПД, определяет основную часть а-в задержки.

Процесс проведения возбуждения в сердце, так же как и все остальные показатели его функциональной активности, регулируется вегетативной нервной системой — блуждающим и симпатическим нервами.

Экстракардиальные нервы вступают в сердце лягушки в области венозного синуса, вблизи впадения верхних полых вен. Регуляторные влияния, поступающие по ним, достигают а-в области по внутрисердечным нервным путям, которые в сердце лягушки образуют два хорошо оформленных нервных стволика, идущих по межпредсердной перегородке.

Цель работы. Ознакомиться с распространением возбуждения в сердце лягушки и механизмами нервной регуляции процесса проведения возбуждения в а-в области.

Методика. Основные приборы и оборудование. Электрокардиограф с чернильной записью; электронный стимулятор; биполярные раздражающие электроды; отводящие фитильковые электроды; чашка Петри с рамкой Граменицкого; термод; раствор ганглиоблокатора. В качестве термод используют стеклянную трубочку небольшого диаметра, через которую пропускают воду при температуре около 35°C. Другой тип термод представляет собой проволоку, закрепленную в пластмассовом держателе, через которую пропускают электрический ток соответствующего напряжения. Сопротивление проволоки и напряжение тока подбирают таким образом, чтобы термод нагревался до 30—35°C.

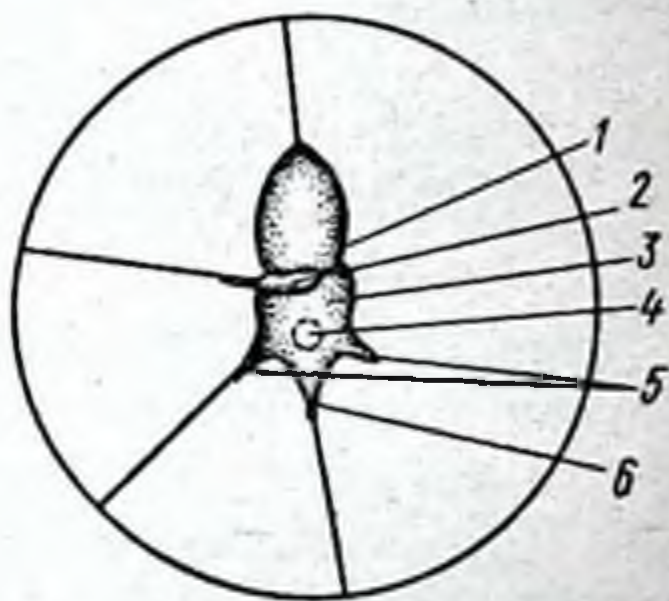


Рис. 117. Изолированное сердце лягушки на рамке Граменицкого:

1 — желудочек. 2 — дуги аорты, 3 — предсердия, 4 — синоаурикулярное отверстие, 5 — верхние полые вены, 6 — нижняя полая вена

Препаровка. 1. Изолируют сердце лягушки, тщательно отпрепаровав все сосуды (кроме легочных) и перевязав их возможно дальше от сердца.

2. Переносят препарат в чашку Петри и укрепляют на рамке Граменицкого (рис. 117). В области слияния трех полых вен хорошо заметно синоаурикулярное отверстие в виде темного пятна со светлыми краями.

3. Делают надрез на нижней полый вене и вводят браншу ножниц в синоаурикулярное отверстие. Несколько приподнимая ткань предсердия, чтобы не повредить лежащую под ним межпредсердную перегородку, разрезают стенку предсердия от синоаурикулярного отверстия до желудочка, а затем вдоль а-в границы по ходу дуг аорты.

4. Край разреза предсердия прошивают хирургической иглой и оттягивают в сторону, укрепив лигатуру на рамке. При этом обнажается межпредсердная перегородка с перегородочными нервами в виде двух тонких беловатых тяжей (иногда с ответвлениями), идущих в направлении от венозного синуса к а-в границе.

Задача 1. Определение локализации водителя ритма с помощью термод

Ход работы. 1. Зарегистрировать ЭГ сердца с помощью фтильковых электродов, один из которых расположен на области венозного синуса, а другой — на желудочке.

2. Прикладывая термод к различным участкам миокарда желудочка, предсердий и венозного синуса, найти область, согревание которой вызывает наиболее выраженное увеличение частоты сердечбиений. Эта область соответствует локализации водителя ритма.

3. Зарисовать препарат, отметив область водителя ритма.

Обработка результатов. Приводят ЭГ, иллюстрирующие изменения ритма при приложении термод к желудочку, а-в области, предсердиям и венозному синусу. Сопоставляют полученные ЭГ.

Задача 2. Изучение путей распространения возбуждения в предсердиях от водителя ритма до атриовентрикулярной области

Ход работы. 1. На том же самом или аналогичном препарате с помощью хирургической иглы подвести под оба перегородочных нерва лигатуру, не затягивая ее.

2. Зарегистрировать ЭГ сердца так, чтобы отчетливо были видны предсердный и желудочковый комплексы.

3. Выключить электрокардиограф. Приподнять за лигатуру перегородочные нервы и перерезать их. После этого вновь зарегистрировать ЭГ.

4. Производить фракционные (по 1—1,5 мм) перерезки трабекулярных структур предсердий до тех пор, пока не разовьется полный а-в блок, о чем судят по исчезновению желудочкового комплекса на ЭГ. До и после каждой перерезки регистрировать ЭГ сердца.

Обработка результатов. Сопоставляют ЭГ, зарегистрированные до и после перерезки нервов и до и после перерезки миокардиальных структур предсердий. О скорости проведения возбуждения в а-в области судят по длительности интервала $P - Q(R)$, соответствующей длительности а-в паузы. На основании полученных данных делают вывод о том, по каким структурам распространяется возбуждение в сердце.

Задача 3. Регуляция проведения возбуждения в сердце

Препаровка. 1. Готовят препарат изолированного растянутого сердца лягушки, как в предыдущих задачах, но вместе с подходящими к нему экстракардиальными вагосимпатическими стволами.

2. Вскрывают предсердие, обнажив межпредсердную перегородку, и отпрепаровывают один из перегородочных нервов.

3. Перевязывают и перерезают один из перегородочных нервов у места выхода его из тканей синусной области.

4. Переносят препарат вместе с рамкой на восковую пластинку.

Ход работы. 1. Положить отпрепарованный экстракардиальный вагосимпатический ствол на раздражающие электроды.

2. Наладить запись ЭГ сердца так, чтобы отчетливо были видны предсердный и желудочковый комплексы.

3. На фоне записи ЭГ включить раздражение нерва на 3—4 с. Примерные параметры раздражения нерва: 3—7 В, 15—20 Гц, 0,5 мс. После выключения раздражения продолжать запись ЭГ еще в течение 7—10 сердечных циклов, чтобы наблюдать процесс восстановления.

4. Поскольку при раздражении экстракардиального нерва наряду с влияниями на скорость а-в проведения неизбежно возникают хронотропные реакции в виде учащения, замедления или полной остановки сердцебиений, нужно использовать раздражение периферического конца перегородочного нерва, чтобы избежать влияния на ритм и иметь возможность наблюдать прямое регуляторное влияние нервов на проведение возбуждения в а-в области.

На том же или аналогичном препарате положить на раздражающие электроды периферический конец перерезанного перегородочного нерва и на фоне записи ЭГ включить раздражение на 3—4 с. Параметры раздражения примерно те же, что при раздражении экстракардиального нерва.

5. Экстракардиальные и внутрисердечные перегородочные нервы лягушки содержат симпатические и парасимпатические нервные элементы. В большинстве случаев при совместном раздражении этих элементов доминируют тормозные влияния, характерные для генерализованного возбуждения парасимпатической иннервации.

Нанести на препарат несколько капель атропина в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл с целью блокады холинергических парасимпатических воздействий и выявления влияния симпатических нервов на а-в проведение. Через 2—3 мин после обработки атропином повторить раздражение перегородочного нерва.

Обработка результатов. Судят о скорости а-в проведения по длительности интервала $P-Q(R)$.

Рекомендуемая литература: [7]; [44]; [48] — гл. 6.

ТЕМА II. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕРДЦА МЕТОДОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОТВЕДЕНИЙ

Ритмичность и сократимость — два основных свойства, лежащие в основе гемодинамической функции сердца.

Особенности функциональной организации отделов сердца основаны на различиях биоэлектрической активности отдельных слагающих их клеточных элементов. Изучение этих различий возможно методом микроэлектродных отведений.

При возбуждении клетки регистрируется с помощью микроэлектрода ПД сердца, графически представляющий собой монофазную кривую (рис. 118), условно разделяемую на следующие компоненты: нулевая фаза — быстрая деполяризация клеточной мембраны; 1-я фаза — ранняя быстрая реполяризация;

2-я — длительная медленная реполяризация (плато); 3-я — конечная фаза ПД. Период диастолы обозначают как 4-ю фазу. Каждой фазе соответствует определенное состояние ионной проводимости мембраны и соответствующая ионная динамика.

ПД клеток разных отделов имеют свои характерные отличия, связанные с их основной функцией. Так, клетки пейсмекерной области сердца имеют признаки биоэлектрической активности, общие для всех структур, обладающих спон-

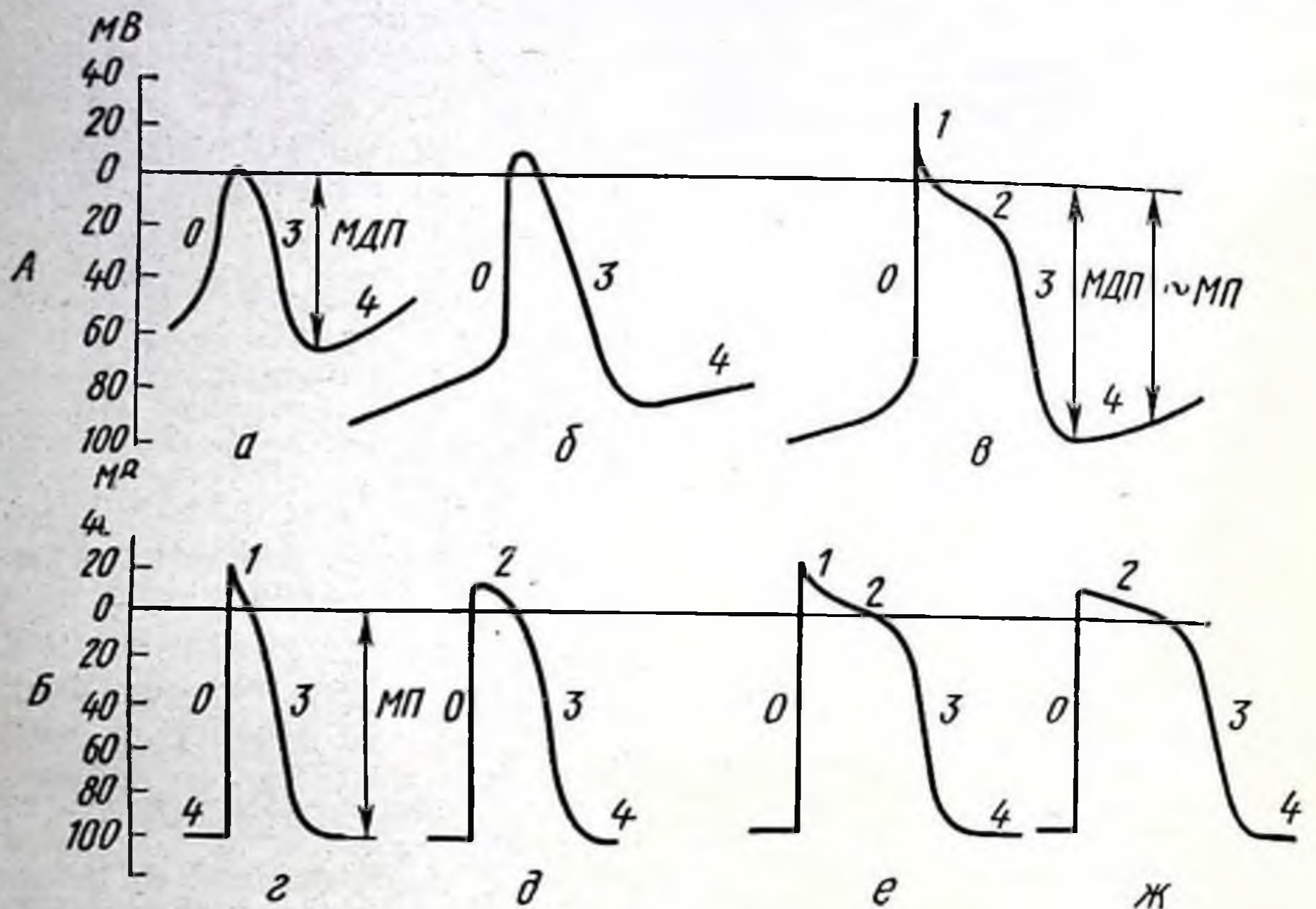


Рис. 118. Потенциалы действия специфических (А) и миокардиальных (Б) клеток сердца:

а, б — ПД истинного и латентного пейсмекера, в — ПД волокна Пуркине, г, д — ПД клеток предсердия, е, ж — ПД клеток желудочка; 1, 2, 3, 4, 0 — фазы ПД. МДП — максимальный диастолический потенциал, МП — мембранный потенциал

танной ритмикой. Такие клетки в сердцах холоднокровных животных расположены в области венозного синуса, у теплокровных сосредоточены в области sulcus terminalis синоатриального узла. ПД, подобные сердечным пейсмекерным потенциалам, регистрируются в матке и в гладкомышечных волокнах сосудов в период возникновения в них спонтанной ритмики. ПД таких клеток характеризуются медленной деполяризацией мембраны в предимпульсный период, в сердце — медленной диастолической деполяризацией (МДД). Другими особенностями пейсмекерных клеток являются сравнительно низкая амплитуда ПД (30—50 мВ для сердца), низкая скорость нарастания ПД, нерасчлененность фаз реполяризации, округлость вершин ПД. Из-за наличия МДД и следовой гиперполяризации, сопровождающей ПД, уровень потенциала покоя в пейсмекерных клетках трудно оценить точно и степень поляризованности мембраны здесь принято характеризовать величиной максимального диастолического потенциала (рис. 118), который определяет степень наибольшей поляризованности мембраны в период диастолы. Величина максимального диастолического потенциала в пейсмекерных клетках составляет 50—70 мВ, что ниже уровня потенциала покоя в клетках других отделов сердца.

ПД, отводимые от разных клеток пейсмекерной области, отличаются друг от друга по форме, амплитуде и степени выраженности МДД, что указывает на гетерогенность пейсмекера как тканевой структуры. По форме ПД клетки пейсмекерной области принято разделять на истинные и латентные. В истинно пейс-

мекерных клетках форма ПД характеризуется всеми вышеперечисленными особенностями (рис. 118, а). В латентных пейсмекерных клетках (рис. 118, б) форма ПД приближается к предсердному типу, МДД нарастает медленно и резко обрывается началом быстрой деполяризации.

Определенный тип активности клетки не является ее постоянным свойством и может меняться в зависимости от функционального состояния и под влиянием взаимодействия с другими клетками пейсмекера. Так как ритмическая активность клеток пейсмекерной области является основой для формирования общего пейсмекерного ритма, все хронотропные влияния на сердце реализуются именно в этой области. Регуляция ритма разрядов в клетках пейсмекера осуществляется путем изменения скорости нарастания МДД, смещения порогового уровня разряда или изменения поляризованности мембраны, в результате которого для достижения порогового уровня потребуется новое время. Все хронотропные воздействия влияют в первую очередь на мембранные процессы, ответственные за формирование биоэлектрической активности пейсмекерных клеток.

Основным эффектом парасимпатической системы, наблюдаемым в эксперименте, является вызываемое ацетилхолином повышение калиевой проницаемости мембраны сердечных клеток. Клетки пейсмекерной области обладают сравнительно небольшой величиной МП (50—70 мВ), существенно отличающейся от величины калиевого равновесного потенциала. При калиевом равновесном потенциале диффузионный поток K^+ по концентрационному градиенту становится равным противоположно направленному потоку этих ионов, обусловленному электрическим полем, возникающим вследствие диффузии K^+ . Калиевый равновесный потенциал определяется по уравнению Нернста и для миокардиальных клеток составляет 95—105 мВ.

Парасимпатические воздействия, повышая калиевую проницаемость, вызывают гиперполяризацию пейсмекерных клеток до величины, приближающейся к значению калиевого равновесного потенциала, что может повлечь за собой остановку пейсмекера или существенное снижение его ритма (рис. 119, а). Падение калиевой проницаемости в ходе диастолы — одна из причин формирования МДД. Увеличение калиевой проницаемости при парасимпатическом воздействии помимо гиперполяризации мембраны снижает скорость нарастания МДД, вызывая остановку пейсмекера или снижение его ритма.

Основной эффект симпатической системы на пейсмекерную область сердца связан с активацией катехоламинами медленных натрий-кальциевых токов, также принимающих участие в формировании МДД в пейсмекерных клетках; их активация приводит к увеличению скорости нарастания МДД и повышению частоты сердцебиений.

ПД предсердий имеют амплитуду 80—100 мВ. В период диастолы МП остается постоянным и составляет 80—95 мВ. Фаза быстрой деполяризации имеет высокую скорость нарастания, стадии реполяризации расчленены слабо (см. рис. 118, г, д.). Длительность ПД предсердий у разных животных различна, но она меньше, чем длительность ПД желудочков того же сердца.

Предсердия богато иннервированы. Холинергические воздействия, включая и раздражение парасимпатических нервов, вызывают в них отрицательную инотропную реакцию. Последняя связана как с ускорением реполяризации, вы-

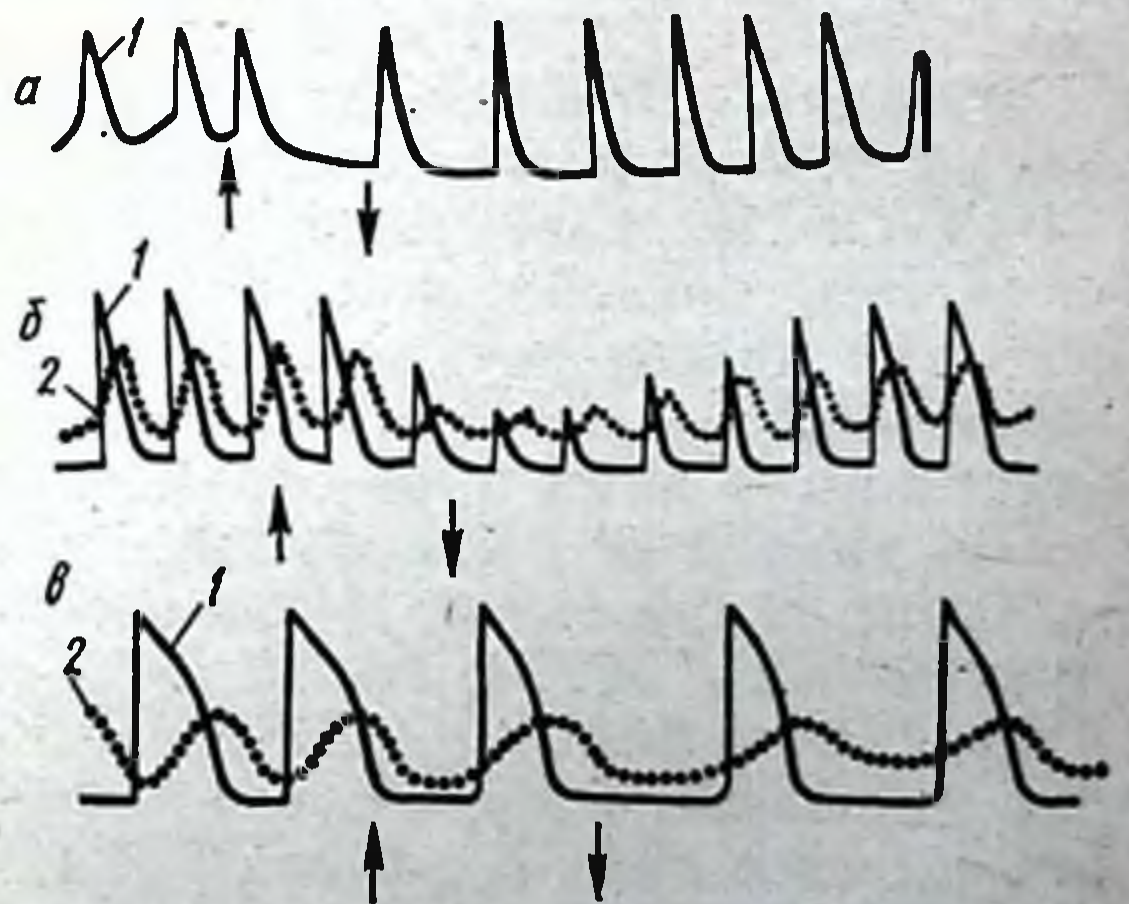


Рис. 119. Реакция клеток синусного узла (а), предсердия (б) и желудочка (в) на раздражение экстракардиальных нервов: 1 — потенциалы действия, 2 — механограмма; стрелками отмечены начало и конец раздражения

званным повышением калиевой проницаемости под влиянием ацетилхолина, так и укорочением плато, обусловленным снижением медленного входящего натрий-кальциевого тока. Таким образом, уменьшение амплитуды сокращения в волокнах предсердий при холинергических воздействиях возникает на фоне укорочения длительности ПД (рис. 119, б).

Уровень поляризованности клеточной мембраны предсердий исходно близок к калиевому равновесному потенциалу, и гиперполяризация при вагусном воздействии, как правило, не наблюдается. Увеличение сократительной активности в волокнах предсердий, возникающее при действии катехоламинов, происходит на фоне увеличения длительности ПД этих волокон, которое связано с активацией медленного входящего натрий-кальциевого тока, участвующего в формировании плато и начальных фаз реполяризации ПД. Этот ток имеет прямую связь с сократительным ответом волокна.

ПД желудочка характеризуются наибольшей по сравнению с другими отделами длительностью, значительная часть которой приходится на фазу плато. Эта фаза наряду с началом 3-й фазы ответственна за сократительную активность клеток сердца. Клетки желудочка, в которых эти фазы выражены наиболее четко, обладают наиболее мощной механической активностью (см. рис. 118, е, ж). Другими особенностями ПД желудочка являются стабильный уровень ПД во время диастолы, высокая скорость нарастания быстрой деполяризации (что указывает на высокую скорость распространения возбуждения), расчлененность фаз реполяризации.

Желудочки иннервированы менее богато, чем предсердия и узловые области, и нейрогуморальные воздействия вызывают в их миокардиальных клетках относительно меньшие изменения. Инотропное торможение так же, как и в предсердиях, сопровождается укорочением длительности ПД. Изменение поляризованности мембраны при раздражении нервов в миокардиальных клетках желудочка не наблюдается, изменение амплитуды ПД наблюдается крайне редко (рис. 119, в).

Таким образом, регистрация ПД разных отделов сердца выявляет связь хронотропных и инотропных вагусных эффектов с изменениями определенных фаз ПД и позволяет подойти к выяснению тонких механизмов функциональной организации сердца и экстракардиальных нервных влияний.

Цель работы. Освоить метод внутриклеточных отведений от сердца. Регистрация и анализ особенностей ПД разных отделов сердца и их изменений при раздражении экстракардиальных нервов.

Методика. Основные приборы и оборудование. Усилитель УБП для внутриклеточных отведений; осциллограф типа С1-18 или С1-19, С1-19Б, С1-4; микроманипулятор типа ММ-1, КМ-1 (при отсутствии микроманипулятора промышленного производства используют микроподачу микроскопа типа МС-51 или изготавливают простейшие механические или гидравлические манипуляторы по описанным в литературе образцам); фоторегистрирующая приставка типа ФОР-1 или ФОР-2 или шлейфовые осциллографы типа Н-102, Н-105, Н-107, Н-700; экранирующая камера; электростимулятор типа ЭСЛ-1, ЭСЛ-2, ЭСУ-1, ЭСУ-2; серебряные раздражающие электроды; трубчатая печь для вытягивания заготовок для микроэлектродов; вертикальный станок для вытягивания микроэлектродов типа МЭ-4 или МЭ-1, МЭ-2, МЭ-3. Перед выполнением экспериментальной работы проводят ряд подготовительных процедур, связанных с изготовлением микроэлектродов.

Изготовление и применение стеклянных микроэлектродов. Микроэлектроды изготавливают из определенных сортов стекла: борсиликатного стекла марки «пирекс», «феликс», «кимакс» и алюмо-

силикатного стекла 48-3С. Из трубок-заготовок заводского производства вытягивают капилляры, из которых в специальных станках готовят микроэлектроды. Для работы на сердце наиболее удобны микроэлектроды с длиной узкой части 10—15 мм и диаметром кончика менее 0,5 мкм. Кончик электрода должен плавно сужаться и при максимальном увеличении светового микроскопа теряться в интерференционной кайме. Микроэлектроды заполняют 2,5—3 М раствором KCl, для чего их помещают в специальный держатель и сначала кипятят в метиловом или этиловом спирте 20—30 мин (кипячение лучше вести под вакуумом), а затем охлаждают до комнатной температуры и переносят в дистиллированную воду, где в течение 1 ч происходит замещение спирта водой. После этого электроды в держателе опускают в раствор KCl. Через 12 ч микроэлектроды готовы к работе. Если для вытягивания микроэлектродов использовать капилляры, в которые предварительно введены 5—7 стеклянных волокон, то процедура заполнения значительно упрощается. В этом случае оттянутые микроэлектроды широким концом погружают в раствор KCl и через 20—30 с под действием капиллярных сил происходит заполнение микроэлектродов.

После заполнения микроэлектроды соединяются с одной стороной переходника, заполненного агар-агаром или каолином, разведенным физиологическим раствором. С другой стороны в переходник вводится хлорированная серебряная проволока, обеспечивающая контакт переходника с входным устройством.

В ряде случаев для работы на сердце бывает рационально использовать «плавающие» микроэлектроды. Для приготовления такого электрода кончик заполненной микропипетки надсекают кварцем на уровне перехода широкой части в узкую. Затем в микропипетку через широкий конец вводят до упора хлорированную серебряную или вольфрамовую проволоку диаметром 30—40 мкм. После этого микропипетку разламывают по надсечке и тонкий конец электрода закрепляют на проволоке нитролаком. После подсыхания лака проволоку или скручивают в спираль, или делают несколько ступенчатых изгибов (рис. 120). Свободный конец проволоки вводят в держатель, соединенный со входом усилительного устройства. Индифферентным электродом служит хлорированное серебро, помещенное в окружающий препарат раствор.

Для оценки качества микроэлектрода необходимо у нескольких заполненных электродов приготовленной партии определить сопротивление. Для этой цели используют промышленный прибор ИС-1 или измерительное устройство предусилителя. Микроэлектрод и индифферентный электрод погружают в перфузионный раствор и подают 1-й калибровочный сигнал. Затем параллельно входу усилителя подключают дополнительное сопротивление, величина которого соизмерима с сопротивлением микроэлектрода, и подают 2-й калибровочный сигнал. Замеряют амплитуду калибровочного сигнала на экране осциллографа в обоих случаях и по следующей формуле производят расчет сопротивления микроэлек-

трода: $R_{\text{мкэ}} = R_{\text{д}}(u_1/u_2 - 1)$, где $R_{\text{мкэ}}$ — сопротивление микроэлектрода, $R_{\text{д}}$ — величина добавочного сопротивления, u_1, u_2 — амплитуда калибровочного сигнала в 1-м и 2-м случае.

Сопротивление микроэлектродов из борсиликатного стекла должно составлять 10—40 мОм, а из алюмосиликатного — выше

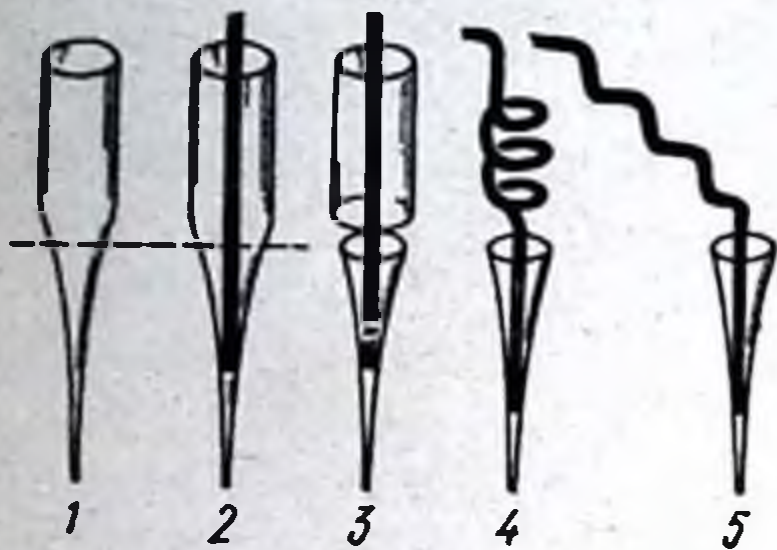


Рис. 120. Приготовление плавающего микроэлектрода:

1, 2, 3, 4, 5 — этапы работы; объяснение см. в тексте

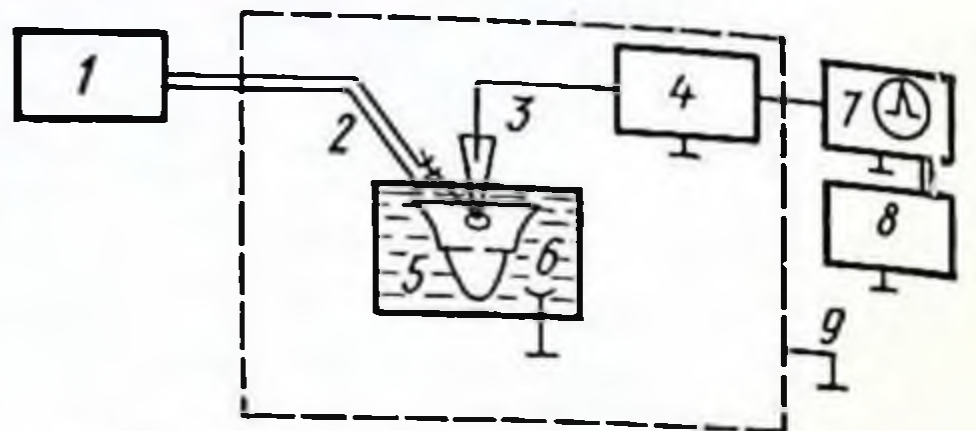


Рис. 121. Функциональная схема установки для внутриклеточных отведений:

1 — стимулятор, 2 — раздражающие электроды, 3 — микроэлектрод, 4 — предусилитель, 5 — перфузионная камера с препаратом, 6 — индифферентный электрод, 7 — осциллограф, 8 — регистрирующее устройство, 9 — экранирующая камера

100 мОм. В ряде схем усилителей бывает предусмотрен набор сопротивлений, путем сравнения с которыми можно определить сопротивление микроэлектрода, минуя расчеты.

Микроэлектродная техника предъявляет особые требования к предусилителям, с которыми можно познакомиться в специальной литературе. Отводимые микроэлектродом изменения МП после предварительного усиления подаются на вход осциллографа для визуального наблюдения. Регистрацию производят с экрана осциллографа фоторегистрирующей приставкой или шлейфовым осциллографом (рис. 121).

Для введения микроэлектродов держатель с микроэлектродом и с выносной головкой предусилителя закрепляют на манипуляторе. Введение микроэлектрода осуществляют вертикальной подачей микроманипулятора при визуальном контроле с помощью бинокулярной лупы.

Препаровка. В задаче используют препарат развернутого сердца лягушки с сохраненными экстракардиальными нервами. 1. Лягушку обездвигивают разрушением спинного и головного мозга и закрепляют на корковой пластинке брюшной стороной вверх.

2. Вскрывают грудобрюшную полость. Для этого на расстоянии 1—2 мм от средней линии живота делают продольный разрез кожи, на уровне плечевого пояса разрезают кожу в поперечном направлении, приподнимают пинцетом мечевидный отросток грудины и рассекают ножницами находящиеся под ним мышечные слои. В образовавшееся отверстие вводят широкую браншу ножниц и рассекают кость плечевого пояса по средней линии. Затем делают

небольшой продольный разрез мышечной стенки живота, отодвигают и фиксируют с помощью булавок рассеченные ткани для обеспечения удобного доступа к сердцу.

3. После вскрытия грудобрюшной полости снимают перикард и удаляют соединительную ткань между сердцем и печенью.

4. На верхушке желудочка закрепляют серфин и приподнимают сердце таким образом, чтобы были видны полые вены.

5. Нижнюю полую вену освобождают от перикарда, перевязывают и отсекают ниже места наложения лигатуры.

6. В пленке, находящейся между легочными сосудами и верхними полыми венами, находят сердечные веточки вагосимпатических нервных стволов. Обычно они расположены вдоль хода вен в виде тонких белых тяжей. Нервы аккуратно освобождают от окружающей ткани на расстоянии 1—2 см, прослеживают до выхода из общего вагосимпатического ствола и отпрепаровывают вместе с вагосимпатическим стволом (препаровка вагосимпатического ствола подробно описана в задачах тем IV и V).

7. Накладывают лигатуру на центральные концы нервов и перерезают их.

8. Накладывают лигатуры на верхние полые вены и дуги аорты, сосуды перерезают.

9. Легочные сосуды перерезают без наложения лигатур.

10. Изолированное сердце помещают в чашку Петри с раствором Рингера и фиксируют в рамке Граменицкого таким образом, чтобы луковица аорты находилась вверху, а полые вены — с нижней стороны препарата. Нижняя полая вена должна быть расположена между двумя верхними полыми венами. Порядок крепления сосудов показан на рис. 122.

11. Вскрывают полость предсердий от а-в границы по ходу линии луковицы аорты по направлению к венозному синусу. Ход линии разрезов на рис. 122, А обозначен пунктиром. Края разрезов прошивают хирургической иглой, берут на лигатуры и растягивают на рамке. Это обеспечивает доступ к эндокардиальной поверхности предсердий.

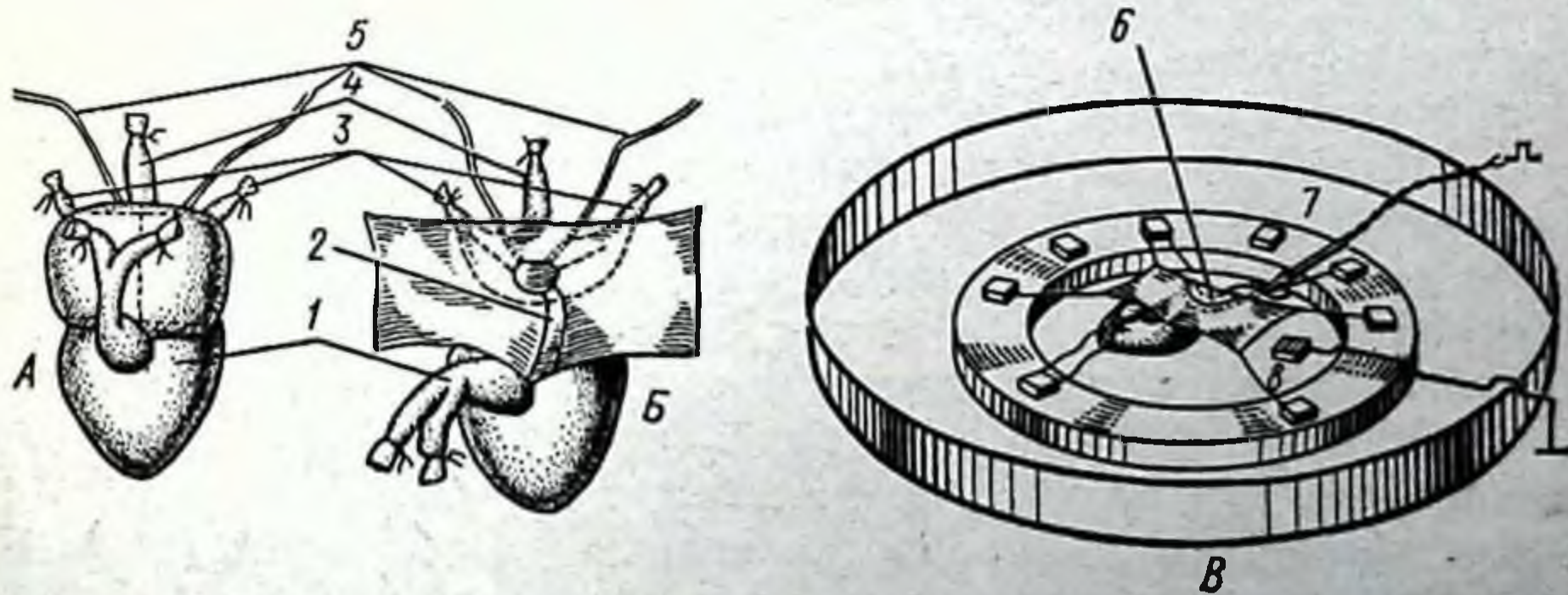


Рис. 122. Этапы приготовления препарата развернутого сердца (А, Б, В):
1 — луковица аорты, 2 — внутрисердечные нервы, 3, 4 — верхние и нижняя полые вены,
5 — экстракардиальные нервы, 6 — микроэлектрод, 7 — раздражающий электрод,
8 — индифферентный электрод; пунктиром показаны направления разрезов

12. Отмывают препарат от крови.

13. Для облегчения доступа к внутренней части венозного синуса в синоаурикулярное отверстие вводят браншу глазных ножниц и делают два надреза синоаурикулярного кольца по направлению хода верхних полых вен.

14. Ослабляют лигатуру, фиксирующую нижнюю полую вену, и располагают ее с нижней стороны венозного синуса. Во избежание перерастяжения препарата несколько ослабляют лигатуры, фиксирующие верхние полые вены. Препарат помещают в перфузионную камеру.

15. Нервы кладут на серебряные электроды, соединенные со стимулятором. Следят за тем, чтобы нервы и лигатура не касались раствора, и во избежание подсыхания нервов периодически мягкой кисточкой аккуратно смачивают их раствором Рингера.

Задача 1. Регистрация ПД миокарда желудочка. Изменение ПД желудочка при раздражении вагосимпатического ствола

Ход работы. 1. Включить катодный осциллограф, усилитель и регистрирующую аппаратуру.

2. Переходник заполнить агар-агаром или каолином. Ввести заполненный микроэлектрод в переходное устройство, подключить переходник ко входу предусилителя.

3. После прогрева приборов с помощью ручки установки нуля предусилителя вывести луч осциллографа на середину экрана.

4. Под визуальным контролем с помощью бинокулярной лупы расположить микроэлектрод на высоте 1—2 мм над поверхностью желудочка. Индифферентный электрод погрузить в омывающий препарат раствор.

5. При помощи вертикальной микроподачи манипулятора осторожно опустить микроэлектрод до соприкосновения с поверхностью перфузионного раствора. В этот момент на экране регистрируется смещение луча. Амплитуда смещения зависит от величины электродного потенциала, который уменьшается при хлорировании, и при хорошем качестве хлорирования не превышает 10—15 мВ.

6. Дальнейшее введение микроэлектрода производить с помощью микроподачи, а при использовании «плавающих» микроэлектродов продолжать пользоваться макроподачей. По мере введения микроэлектрод начинает касаться поверхности клеточной мембраны, прогибать ее, иногда прокалывать и вновь выходить. При этом на экране осциллографа регистрируются отклонения луча вниз, неправильные по форме и совпадающие по частоте с сердечным ритмом. Бывает целесообразно несколько раз приподнять электрод и попытаться ввести его вновь. Наконец, на экране регистрируется скачок потенциала величиной более 80 мВ, и на новом устойчивом уровне луч начинает писать правильные по форме ПД. Электрод находится в клетке. Включить регистрирующее устройство и

записать отводимые потенциалы (скорость записи 10—20 мм/с). Для оценки амплитуды регистрируемых потенциалов записать калибровочный сигнал усилителя.

7. В случае устойчивой картины на экране записать реакцию клеток на нервное воздействие (нервные стволы уже расположены на электродах). Включить стимулятор и подобрать параметры раздражения (частота 5—20 имп/с, амплитуда 1—10 В, длительность импульса 0,1—0,2 мс). Проследить и зарегистрировать изменения биоэлектрической активности при стимуляции вагосимпатического ствола.

Все движения экспериментатора после введения микроэлектрода должны быть сведены к минимуму и быть очень осторожными, так как небольшой толчок может вывести удачно введенный электрод или сломать его. В случае поломки электрода наблюдается резкое падение амплитуды регистрируемых колебаний и дрейф луча, амплитуда калибровочного сигнала при этом несколько возрастает. Сломанный электрод следует заменить.

Задача 2. Регистрация ПД клеток предсердий. Изменение ПД предсердий при раздражении экстракардиальных нервов

Ход работы. 1. Микроэлектрод с помощью горизонтальной подачи микроманипулятора расположить над эндокардиальной поверхностью развернутых предсердий (отведение потенциала от наружной поверхности предсердий затруднено, так как покрывающий предсердия плотный слой эпикарда препятствует успешному введению микроэлектрода).

2. Введение микроэлектрода осуществить так же, как в 1-й задаче. Ввести микроэлектрод в клетки предсердий и зарегистрировать ПД разных клеток этого отдела. Записать калибровочный импульс.

3. Во время стабильной регистрации ПД включить стимулятор и зарегистрировать изменения ПД при раздражении вагосимпатического ствола.

Задача 3. Регистрация ПД клеток венозного синуса. Изменение ПД венозного синуса при раздражении экстракардиальных нервов

Ход работы. 1. С помощью бинокулярной лупы найти наиболее плотное скопление клеток венозного синуса и расположить над ним электрод.

2. Отведение биоэлектрической активности и регистрацию ПД осуществить так же, как в 1-й задаче.

3. При стабильном нахождении микроэлектрода в клетках венозного синуса записать изменения ПД при раздражении экстракардиальных нервов.

4. По окончании работы выключить установку и проявить пленку.

Обработка результатов. Описывают полученные результаты. Определяют величину амплитуды и длительности ПД каждого отдела, максимальный диастолический потенциал для клеток венозного синуса, потенциал покоя для клеток предсердий и желудочка, амплитуду и скорость нарастания МДД в клетках венозного синуса. Описывают изменения формы ПД и особенности реакций разных отделов при раздражении экстракардиальных нервов.

Рекомендуемая литература: [7] — с. 63—68, 72—82, 100—106, 112—115, 135—152; [44] — гл. 2; [48] — гл. 4, 5; [51] — с. 142—163.

ТЕМА III. ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММА: МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ, АНАЛИЗ, ФОРМИРОВАНИЕ

Возникающие на поверхности сердца в процессе возбуждения изменения электрических зарядов создают в окружающем его пространстве динамические электрические токи, которые могут быть зарегистрированы в виде переменной разности потенциалов на поверхностных покровах организма двумя электродами, наложенными на разные участки поверхности тела.

Измерение этой разности потенциалов осуществляют электрокардиографом, усиливающим слабые потенциалы сердца и регистрирующим их в виде полифазной кривой, зубцы и интервалы которой отражают активацию и процессы восстановления в разных участках сердца. Таким образом, электрокардиограмма (ЭКГ) представляет собой графическое отображение динамики суммарного вектора ЭДС сердца в проекции на линию отведения, проходящую между двумя отводящими электродами.

В сердце теплокровных животных и человека возбуждение возникает в синоаурикулярном узле и затем распространяется на предсердие. На ЭКГ возбуждение синоаурикулярного узла не регистрируется, оно выявляется только специальными методами. Началу возбуждения предсердий соответствует зубец *P* ЭКГ (рис. 123), его длительность 0,08—0,1 с, амплитуда 0,05—0,25 мВ. За зубцом *P* следует интервал *PQ* длительностью 0,12—0,2 с, за это время происходит передача возбуждения а-в узлу.

Комплекс *QRS* соответствует охвату возбуждением рабочей мускулатуры желудочков. Весь процесс от начала возбуждения до полного охвата возбуждением желудочков продолжается в среднем 0,06—0,09 с; амплитуда зубца *Q* не превышает 0,2 мВ, зубца *R* колеблется от 0,3 до 1,6 мВ. Зубец *S* имеет амплитуду 0—0,6 мВ и соответствует моменту полного охвата возбуждением желудочков. После комплекса *QRS* регистрируется изоэлектрический интервал *S—T*, в течение которого вся поверхность желудочков остается возбужденной. Длительность *S—T* колеблется от 0 до 0,15 с и зависит от длительности всего желудочкового комплекса *QRST*. В норме сегмент *S—T* отклоняется от изоэлектрического уровня не более чем на 0,1 мВ.

Началу восстановительного процесса в желудочках соответствует появление зубца *T*, с окончанием которого восстановление полностью завершается. Амплитуда зубца *T* обычно составляет 0,25—0,6 мВ, длительность — 0,25 с. После зубца *T* регистрируется изоэлектрический интервал, соответствующий расслаблению сердца.

Величина разности потенциалов, улавливаемая электродами, зависит от расстояния электродов до источника возбуждения, степени электропроводности ткани между сердцем и электродами и массы элементов, генерирующих электродвижущую силу. Поэтому для сравнения разных

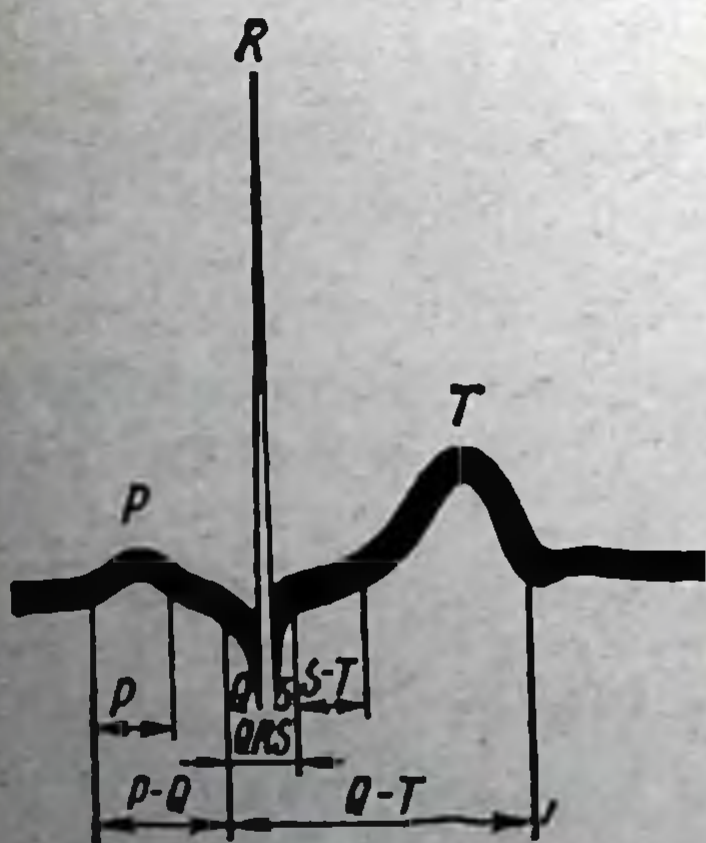


Рис. 123. Схематическое изображение ЭКГ (объяснение см. в тексте)

ЭКГ отводящие электроды накладывают на строго определенные участки тела; этим отличаются различные методы отведения. Основными методами являются отведения от конечностей, или стандартные отведения, и грудные отведения. Стандартные отведения приняты как обязательный метод, так как они регистрируют колебания потенциалов во фронтальной плоскости от больших поверхностей. Грудные отведения регистрируют колебания потенциалов от более ограниченных участков, находящихся под активным электродом.

Амплитуда и длительность зубцов ЭКГ, а также величина интервалов закономерно меняются при различных воздействиях на сердце (физическая нагрузка, изменение положения тела,

задержка и изменение дыхания и т. д.). Эти изменения могут быть обусловлены, с одной стороны, чисто физическими явлениями, например, изменением положения сердца в грудной клетке при дыхании или перемене позы, изменением электропроводности тканей между сердцем и отводящим электродом при дыхании. С другой стороны, они могут быть обусловлены физиологическими причинами: изменение венозного притока, рефлекторные влияния, изменяющие ритм работы сердца, скорость проведения в нем. Более глубокие изменения ЭКГ наблюдаются при различных патологических процессах в сердце, они обусловлены изменением хронотопографии возбуждения, гипертрофией сердца при его недостаточности, возникновением эктопических очагов. Разработаны нормативы, определяющие границы физиологических изменений ЭКГ и позволяющие диагностировать различные нарушения в работе сердца, что определило распространение электрокардиографического метода в клинике.

Для правильной оценки изменений, наблюдаемых в ЭКГ, необходимо представлять механизм формирования электрокардиографической полифазной кривой. Эта задача сложна, так как до настоящего времени не выяснено влияние на распространение электрического поля и формирование ЭКГ электрических свойств тканей тела. Поэтому в экспериментальной работе широко принят метод отведения электрической активности непосредственно с поверхности сердца; получаемые при этом кривые называют электрограммами (ЭГ). При биполярном отведении от любого отдела сердца регистрируется ЭГ, напоминающая желудочковый комплекс *QRST*. При внутриклеточном отведении биоэлектрической активности ПД отдельных клеток регистрируются в виде монофазной электрограммы (МЭГ), которую можно получить и при экстраклеточной регистрации, если участок миокарда под одним из отводящих электродов любым способом лишить возможности возбуждаться. Так, если под одним из отводящих электродов поместить кусочек некротизированной ткани, то миокард в этом участке выключается из возбуждения, так как ионы K^+ , выделяющиеся из некротизированной ткани, деполяризуют миокард и делают его невозбудимым. ЭГ при этом постепенно изменяется, принимая вид монофазной кривой (рис. 124, 2, 3). После удаления некротизированной ткани постепенно восстанавливается исходная форма ЭГ (рис. 124, 4—7).

Если некротизированную ткань поместить под второй электрод, то ЭГ также приобретает вид монофазной кривой, но иной полярности. На основании этих опытов можно предположить, что полифазная ЭГ формируется как алгебраическая сумма колебаний потенциала, имеющих место под каждым из отводящих электродов или в обеих сферах отведения. Такие представления о формировании полифазной ЭГ развивает дифференциальная теория ЭГ.

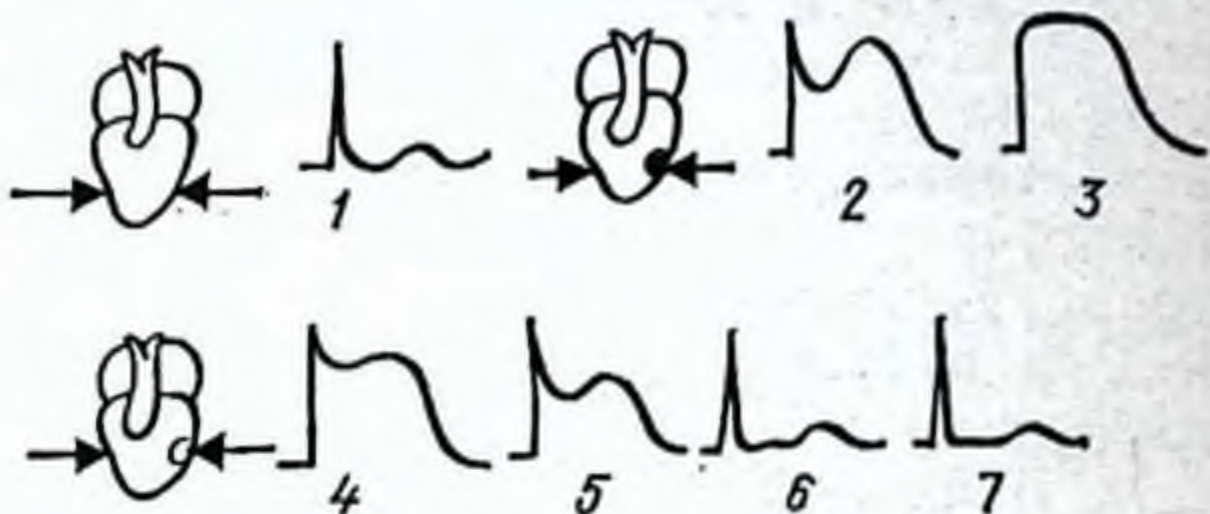


Рис. 124. Изменения ЭГ желудочка при наложении под один из отводящих электродов некротизированной ткани:

1 — исходная ЭГ, 2, 3 — ЭГ после наложения некротизированной ткани, 4, 5, 6, 7 — восстановление исходной формы после снятия некротизированной ткани; стрелками показано расположение отводящих электродов

Цель работы. Ознакомиться с общей электрофизиологией сердца и основами электрокардиографии с помощью регистрации и анализа ЭКГ человека в стандартных отведениях; изучить изменения ЭКГ при физических воздействиях на сердце; провести экспериментальный анализ формирования ЭКГ и ЭГ и их изменений при патологии сердца.

Задача 1. Регистрация и анализ электрокардиограммы человека

Методика. Основные приборы и оборудование. Электрокардиограф типа ЭЛКАР-4, ЭЛКАР-6 или ЭКСПЧ-24; отводящие электроды; кушетка.

Ход работы. 1. Ознакомиться с инструкцией по эксплуатации электрокардиографа, прибор заземлить.

2. Включить прибор в сеть и при нулевом положении переключателя отведений дать ему прогреться 10–15 мин. Отрегулировать усиление таким образом, чтобы калибровочному сигналу в 1 мВ соответствовало отклонение пистика на 1 см.

3. Подготовить испытуемого к исследованию. Для этого предложить ему лечь и максимально расслабиться. Предплечья и голени в местах наложения электродов освободить от одежды и обработать эфиром. Марлевые бинты смочить физиологическим раствором, подложить под отводящие электроды, последние закрепить на руках и ногах с помощью резинового бинта. Подключить к отводящим электродам провода «шланга пациента» в такой последовательности: красный — внутренняя поверхность правого предплечья, желтый — внутренняя поверхность левого предплечья, зеленый — внутренняя поверхность левой голени, черный — внутренняя поверхность правой голени (рис. 125).



Рис. 125. Расположение электродов при стандартных отведениях ЭКГ: I, II, III (объяснение см. в тексте)

4. Установить переключатель отведений в положение I, затем нажать кнопку успокоителя и проконтролировать работу по колебаниям пистика. Включить лентопротяжный механизм и записать ЭКГ и калибровочный импульс.

5. Перевести переключатель в положение II и III и аналогичным образом сделать записи во 2-м и 3-м отведениях.

6. Посадить испытуемого на стул и зарегистрировать ЭКГ в трех стандартных отведениях.

7. Зарегистрировать ЭКГ в трех стандартных отведениях в положении стоя.

8. Предложить испытуемому сделать 8–10 приседаний, после чего зарегистрировать ЭКГ в трех стандартных отведениях в положении лежа.

9. После отдыха испытуемого в положении лежа зарегистрировать ЭКГ в трех отведениях при задержке дыхания на вдохе, при редком глубоком дыхании и при напряжении мышц брюшного пресса.

Обработка результатов. Проводят анализ полученных кривых: просчитывают амплитуду и длительность зубцов ЭКГ, длительность интервалов. Сравнивают полученные кривые с имеющимися в литературе нормативами. Прослеживают зависимость изменения формы кривых ЭКГ от положения тела испытуемого. Объясняют полученные данные. Прослеживают изменения ЭКГ после нагрузки, при задержке дыхания, при напряжении мышц брюшного пресса.

**Задача 2. Условия регистрации и соотношения
между ЭГ и ЭКГ. Изменения ЭГ, ЭКГ
при экспериментальном «инфаркте» на изолированном
сердце лягушки**

Методика. Основные приборы и оборудование. Электрокардиограф типа ЭЛКАР-4, ЭЛКАР-6 или ЭКПСЧ-24; пробковая пластинка, залитая воском с 6 клеммами для подключения «шланга пациента» и отводящих фитильковых электродов для регистрации ЭКГ и ЭГ изолированного сердца; фитильковые электроды; фильтровальная бумага, набор инструментов для препаровки.

Препаровка. В задаче используют препарат изолированного сердца лягушки. 1. Лягушку обездвигивают разрушением спинного и головного мозга.

2. Вскрывают грудобрюшную полость и освобождают сердце и прилегающие сосуды от перикарда.

3. Во избежание повреждения сердца в данной задаче не следует пользоваться серфином. Для удобства препаровки сосудов на сердце по а-в границе накладывают лигатуру из толстого ватного фитилька, смоченного раствором Рингера. К лигатуре прикрепляют серфин и закрепляют сердце в приподнятом положении.

4. Дуги аорты и впадающие в сердце вены перевязывают в такой последовательности: нижняя полая вена, дуга аорты, левая и правая полые вены.

5. Перевязанные сосуды и легочные вены отсекают. При препаровке избегают повреждения миокарда, так как это может привести к существенным искажениям формы регистрируемых кривых.

6. Изолированное сердце кладут на сложенную вдвое фильтровальную бумагу, смоченную раствором Рингера, и помещают на восковую пластинку. Восковая пластинка имеет клеммы, к которым с одной стороны нужно подключить провода «шланга пациента» электрокардиографа, а с другой — фитильковые электроды, служащие для регистрации электрической активности изолированного сердца.

Ход работы. 1. Ознакомиться с инструкцией по эксплуатации электрокардиографа. Прибор заземлить. Приготовить препарат изолированного сердца лягушки и разместить его на восковой пластинке.

2. Включить прибор в сеть и при нулевом положении переключателя отведений дать ему прогреться 10—15 мин. Подобрать усиление прибора таким образом, чтобы на всех трех каналах сигналу в 1 мВ соответствовало отклонение луча на 1 см.

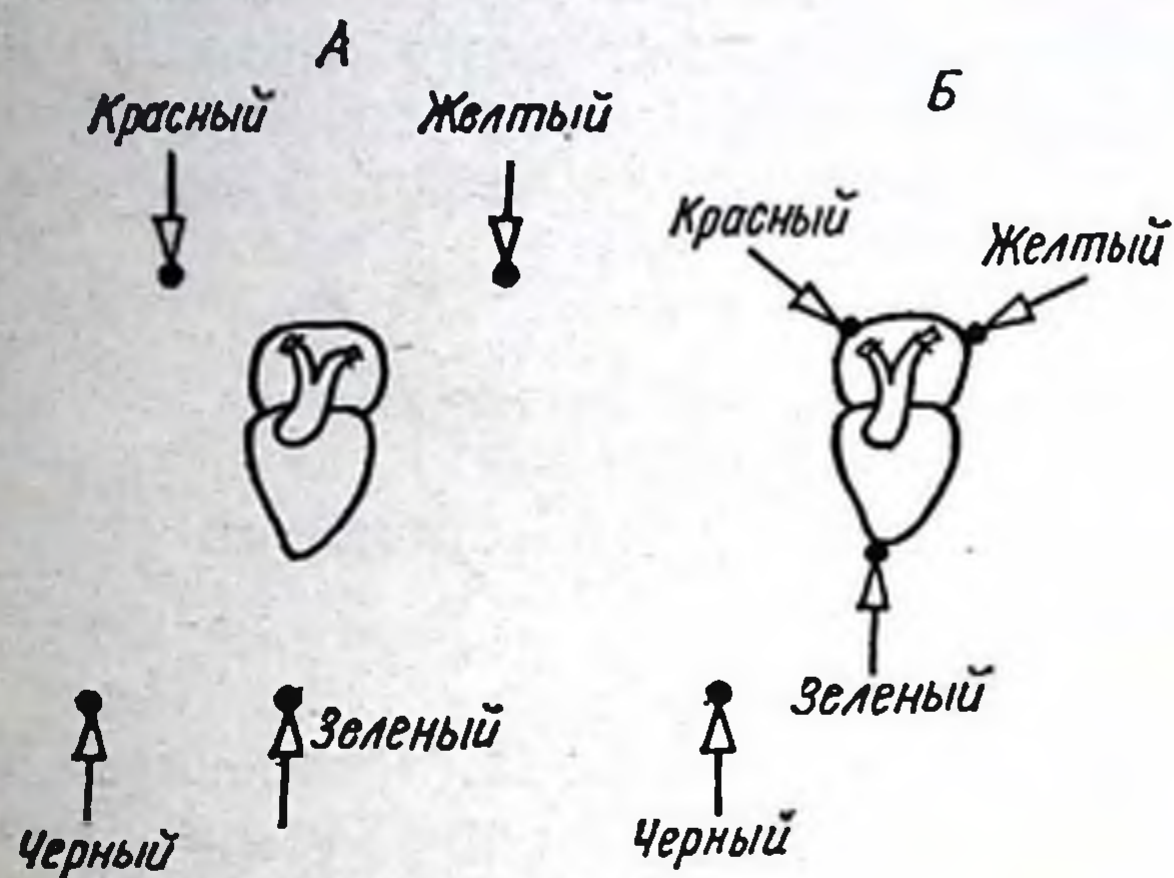


Рис. 126. Расположение отводящих электродов (для задачи 2; объяснение см. в тексте)

3. Провода «шланга пациента» подключить к клеммам восковой пластинки. В 1-й части задачи используют провода с красной, желтой, зеленой и черной фишками. Подготовить фитильковые электроды и закрепить их на металлических отводящих электродах, фитильковые электроды смочить раствором Рингера.

4. Наложить фитильковые электроды на фильтровальную бумагу на расстоянии 1 см от поверхности сердца в порядке, соответствующем указанному на рис. 126, А.

5. Зарегистрировать ЭКГ изолированного сердца. Для этого переключатель отведений поставить в положение I. Длительность записи вести из расчета 4—6 циклов для отчета каждого участника эксперимента. Записать калибровочный сигнал.

6. На боковую поверхность желудочка наложить некротизированную ткань (кусочек прижатой омертвевшей мышцы) и зарегистрировать изменения ЭКГ. Снять некротизированную ткань и зарегистрировать постепенное восстановление формы ЭКГ.

7. Провести запись ЭКГ при наложении некротизированной ткани на вентральную поверхность желудочка.

8. Переместить отводящие электроды с фильтровальной бумаги на поверхность сердца (рис. 126, Б). Зарегистрировать ЭГ и записать калибровочный сигнал.

9. Наложить некротизированную ткань на боковую поверхность желудочка и зарегистрировать изменения и восстановление ЭГ.

Обработка результатов. Сравнивают ЭКГ и ЭГ. Анализируют кривые, объясняют полученные данные. Отмечают смещение интервала S—T и увеличение зубца T при наложении некротизированной ткани.

Задача 3. Связь зубцов ЭГ с активностью разных отделов сердца

Методика. Используют те же приборы и оборудование, что в задаче 2, и рамку Граменицкого.

Ход работы. 1. Приготовить препарат изолированного сердца лягушки и разместить его в рамке Граменицкого. Рамку с препаратом перенести на восковую пластинку, покрытую фильтровальной бумагой, смоченной раствором Рингера. По атриовентрикулярной и синоаурикулярной границе подвести лигатуру. Лигатуру не затягивать.

2. Один из фитильковых электродов разместить на поверхности предсердий, другой — на желудочке на возможно большем удалении друг от друга. Отводящие электроды подключить к красному и желтому проводам «шланга пациента», переключатель отведений поставить в положение I и записать исходную ЭГ.

3. Затянуть лигатуру по а-в границе препарата (2-я лигатура Станниуса) и после остановки желудочка вновь записать ЭГ.

4. Желудочек отсечь по а-в границе, оба электрода разместить на левом и правом предсердиях. Зарегистрировать ЭГ предсердий. Поместить один из отводящих электродов на венозный синус и снова зарегистрировать ЭГ.

5. При неизменном положении электродов наложить лигатуру на границу венозного синуса (1-я лигатура Станниуса) и зарегистрировать изменение ЭГ. При необходимости увеличить усиление и записать калибровочный сигнал.

6. Отсечь предсердия по синоаурикулярной границе, перенести оба электрода на синус. Проследить, чтобы после изоляции синуса в препарате полностью отсутствовала предсердная ткань. Зарегистрировать ЭГ венозного синуса.

7. Перенести оба электрода на поверхность изолированного желудочка. Механическим раздражением стимулировать в изолированном желудочке возникновение а-в ритма и зарегистрировать ЭГ.

Обработка результатов. Анализируют и описывают полученные данные. Обращают внимание на форму и длительность ЭГ разных отделов, сопоставляют их с общей ЭГ интактного препарата.

Задача 4. Монофазная ЭГ (МЭГ) как основная форма биоэлектрической активности сердца

Методика. Задачу проводят на препарате изолированного сердца лягушки в тех же методических условиях, что для 2-й и 3-й задач данной темы. Для регистрации МЭГ наряду с фитильковыми электродами можно использовать электроды-присоски, представляющие собой тонкие пипетки, вытянутые из толстостенной полиэтиленовой трубки. Диаметр кончика такой пипетки может быть разным, для данной задачи удобна величина 0,5 мм. Боковую поверхность такой пипетки прокалывают, вводят внутрь серебряную

проволочку, затем отверстие запаивают расплавленным полиэтиленом, к проволочке припаивают провода для подачи на вход электрокардиографа. Пипетку с помощью полиэтиленового шланга соединяют со шприцем, поршень которого смонтирован на винтовой подаче, а корпус неподвижно закрепляют. Всю систему заполняют перфузионным раствором и закрепляют пипетку с подпаянной проволочкой на подвижном держателе. Пипетку приводят в соприкосновение с миокардиальной тканью и с помощью шприца подсасывают небольшой участок миокарда. 2-й электрод (индифферентный) должен находиться в омывающем растворе. Преимуществом этих электродов являются локальность регистрации биоэлектрической активности и хорошее качество записи.

Ход работы. 1. Приготовить изолированное сердце лягушки и поместить его на восковую пластинку.

2. С помощью раскаленного зонда прижечь участок миокарда на боковой поверхности желудочка.

3. На поврежденный участок поместить один из отводящих электродов, 2-й — на интактный участок. Для отведения использовать красный и желтый электроды, переключатель отведений поставить в положение I. Зарегистрировать МЭГ.

4. Для выяснения, какая из зон отведения формирует монофазное колебание потенциала, под каждый из отводящих электродов, начиная с интактного, поместить кусочек фильтровальной бумаги, смоченной 1%-ным раствором KCl (раствор KCl вызывает деполяризацию активного участка и изменяет форму МЭГ). Зарегистрировать наблюдаемые изменения.

Обработка результатов. Объяснить и описать полученные данные.

Задача 5. Генерация полифазной ЭГ

Методика. Основные приборы и оборудование. Векторкардиограф ВЭКС-4М или электрокардиографы типа ЭЛКАР-4, ЭЛКАР-6. При применении электрокардиографов используют 3 независимых входа, порядок работы такой же, как при использовании векторкардиографа. Остальное оборудование, как в предыдущих задачах. Дальнейшее описание дано для использования ВЭКС-4М.

Ход работы. 1. Приготовить препарат изолированного сердца лягушки и повредить прижиганием боковую поверхность желудочка.

2. К клеммам восковой пластинки подключить все три пары отводящих электродов.

3. Включить векторкардиограф, дать ему прогреться 10—15 мин. Подобрать одинаковое усиление по всем трем каналам.

4. Зарегистрировать МЭГ основания желудочка и верхушки. Для этого (рис. 127, А) 1-й электрод пары г-д поместить на поврежденный участок, 2-й — на основание желудочка. 1-й электрод пары б-в поместить на поврежденный участок, 2-й — на верхушку желудочка. 1-й электрод пары а-е поместить на основание желудка, 2-й — на верхушку.

5. Зарегистрировать две МЭГ и фазную ЭГ: переключатель отведений находится в положении 7; МЭГ должны быть направлены в разные стороны: МЭГ основания — вверх; чтобы электроды каждой отводящей пары находились в одной и той же точке отведения, соединить между собой клеммы коричневый — белый, красный — желтый, зеленый — голубой и пользоваться одним фитильком в каждой зоне отведения или, не соединяя клемм, накладывать один фитилек на другой. В процессе работы смачивать фитильковые электроды, в то же время поверхность сердца не должна быть чрезмерно влажной.

Обработка результатов.

Полученные кривые МЭГ делят точками на равные промежутки времени и производят алгебраическое сложение (рис. 127, В). Сравнивают полученную теоретическую кривую с экспериментальной кривой. Результаты объясняют.

Рекомендуемая литература: [8] — с. 5—19, 29, 89—96, 130—132, 136—139; [22] — с. 35—41; [44] — с. 264—284.

ТЕМА IV. АНАЛИЗ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ВЛИЯНИЙ НА СЕРДЦЕ

Основными показателями деятельности сердца служат частота и сила сердечных сокращений. Механизмы, управляющие активностью сердца, должны быстро и в широких пределах изменять эти показатели и обеспечивать приспособительные изменения в скорости клеточных и тканевых процессов в миокарде. Всем этим требованиям удовлетворяют нервные механизмы регуляции.

Вегетативная нервная регуляция деятельности сердца осуществляется по центробежным волокнам блуждающего и симпатического нервов. Тела преганглионарных парасимпатических нейронов, иннервирующих сердце, находятся в продолговатом мозге (n. dorsalis и n. ambiguus). Вступая в сердце, преганглионарные парасимпатические волокна образуют синапсы на нервных клетках, входящих в состав внутрисердечных ганглиев. Каждое преганглионарное волокно многократно ветвится и иннервирует несколько внутрисердечных нейронов (фе-

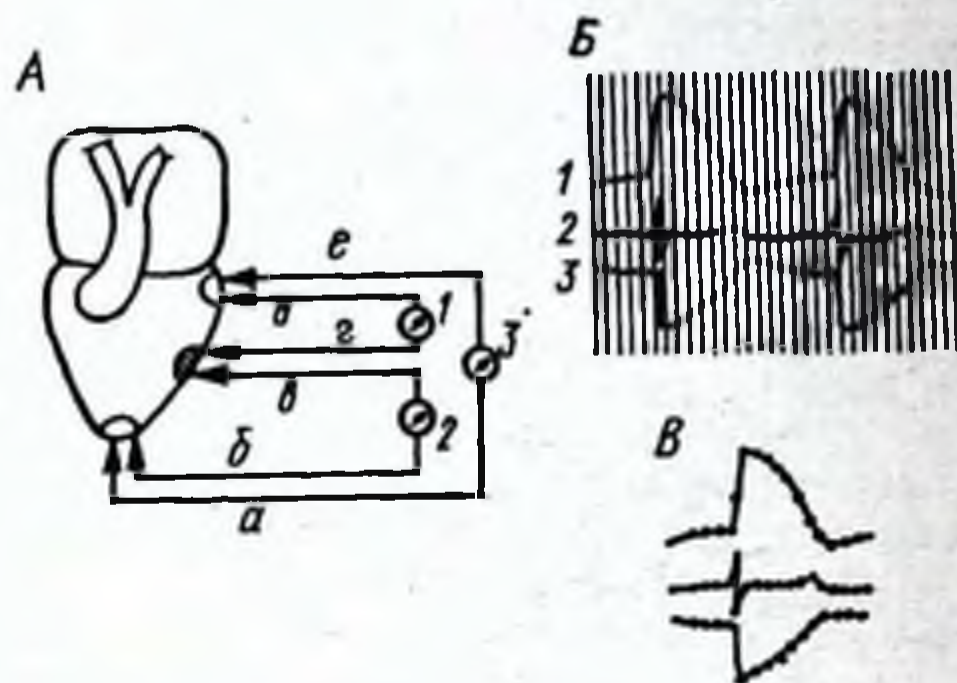


Рис. 127. Расположение отводящих электродов (А) и построение теоретической кривой (В) на основе экспериментальных ЭГ (Б—1, 2, 3):

а — белый электрод, б — желтый, в — голубой, г — красный, д — коричневый, е — зеленый

номен мультипликации). В свою очередь терминали нескольких преганглионарных аксонов могут сходиться на одном нейроне (феномен конвергенции). Постганглионарные парасимпатические волокна оканчиваются на эффекторных клетках предсердий и желудочков.

Преганглионарные нейроны симпатической нервной системы, передающие импульсы к сердцу, расположены в боковых рогах пяти верхних сегментов грудного отдела спинного мозга. Отростки этих нейронов заканчиваются в шейных и верхних грудных узлах симпатической цепочки, здесь же находятся вторые нейроны (постганглионарные), отростки которых идут к сердцу. Большая часть симпатических нервных волокон, иннервирующих сердце, отходит от звездчатого ганглия.

Нервный механизм адаптивной регуляции сердца объясняется функциональным антагонизмом регуляторных свойств парасимпатического и симпатического отделов. В основе этого представления лежат данные, согласно которым при электрической стимуляции всей совокупности парасимпатических или симпатических нервных элементов эти отделы вегетативной нервной системы оказывают функционально разнородные эффекты на основные показатели деятельности сердца: парасимпатическая нервная система тормозит работу сердца, симпатическая активация усиливает ее.

Антагонистические влияния со стороны парасимпатического и симпатического отделов связывают с качественной специфичностью их медиаторов. Медиатором парасимпатического отдела является ацетилхолин, выделение которого приводит к специфическим изменениям мембранной проницаемости миокардиальных клеток и, как следствие, к отрицательным эффектам на сердце. В симпатических

постганглионарных терминалях выделяются катехоламины, обуславливающие положительные сдвиги показателей деятельности сердца (подробнее см. тему II этого раздела).

Указанные особенности функционирования отделов вегетативной нервной системы наблюдаются в случае массивной электрической стимуляции нервных элементов. Однако в условиях натуральной рефлекторной регуляции импульсная активность в эфферентных путях блуждающего нерва существенно отличается от активности, возникающей в ответ на экспериментальное вмешательство. Это различие заключается в числе одновременно возбуждающихся нервных элементов, во временной последовательности возбуждения и в пространственном распределении конечного импульсно-медиаторного влияния на эффекторные ткани сердца, особенно по отношению к пейсмекерной области.

Регуляторные влияния парасимпатического отдела по отношению к ритму зависят от количественных показателей качественно однородного холинергического импульсного воздействия. При одновременном возбуждении всех парасимпатических эфферентных элементов возникает отрицательный хронотропный эффект, наблюдаемый в опытах с электрическим раздражением всей массы парасимпатических волокон. Уменьшение числа активных парасимпатических нервных элементов, а также уменьшение частоты и длительности импульсного воздействия приводит к появлению положительных влияний на ритм.

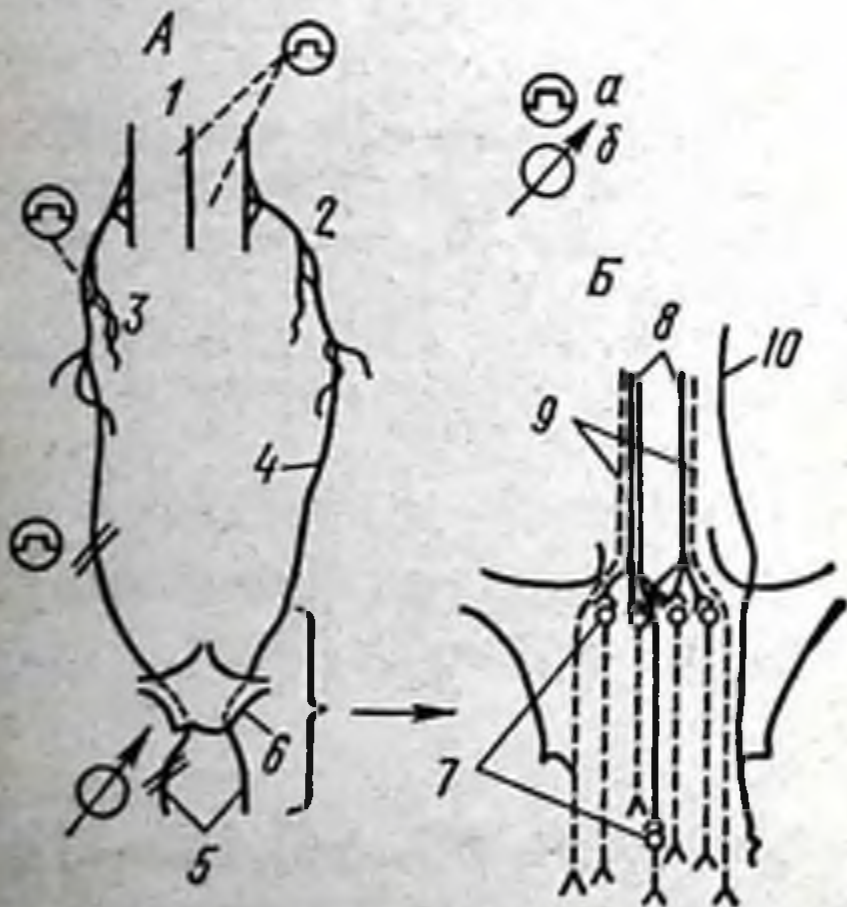


Рис. 128. Иннервация синусной области сердца лягушки. А — общий вид; Б — внутрисердечная эфферентная иннервация:

1 — продолговатый мозг, 2 — яремный ганглий, 3 — симпатический ганглий, 4 — вагосимпатический ствол, 5 — внутрисердечные нервы, 6 — венозный синус, 7 — постганглионарные парасимпатические нейроны, 8 — парасимпатические преганглионарные (сплошные линии) и постганглионарные (прерывистые линии) волокна, 9 — симпатические постганглионарные волокна, 10 — центральные афферентные пути; а — места раздражения нервных путей, б — регистрация импульсной активности

Разнонаправленный характер парасимпатических регуляторных воздействий на ритм сердца ставит вопрос о внутреннем механизме действия парасимпатического медиатора ацетилхолина на проницаемость мембран пейсмекерных клеток. В связи с этим возникает необходимость в новой интерпретации регуляторных взаимоотношений между парасимпатической и симпатической иннервацией. Полагают, что регуляторные возможности нервных влияний на сердце могут меняться в широких пределах и совершенствоваться при комбинированном воздействии парасимпатического и симпатического отделов.

Организация сложных регуляторных взаимоотношений между обоими отделами вегетативной нервной системы является функцией центральных аппаратов, координирующих адаптивные нервные воздействия на сердце и его активность.

Одним из удобных объектов для изучения экстракардиальных нервных влияний является сердце лягушки, иннервируемое общим вагосимпатическим стволом, в состав которого входят симпатические постганглионарные и парасимпатические преганглионарные волокна. Соединение этих волокон в общий вагосимпатический ствол происходит выше яремного ганглия (рис. 128). К сердцу парасимпатические и симпатические волокна подходят в составе сердечной веточки. Внутри сердца нервные волокна идут по межпредсердной перегородке в виде двух хорошо оформленных нервных стволиков (внутрисердечные, или перегородочные нервы). Таким образом, внутрисердечные нервы состоят из симпатических и парасимпатических постганглионарных волокон, а также парасимпатических преганглионарных волокон, переключающихся по ходу нервов. Кроме того, в их составе идут афферентные волокна. По ходу внутрисердечных нервов располагаются скопления ганглиозных клеток: *узел Ремака* в синусной области, *узел Людвига* в предсердной части и *узел Биддера* в а-в области. Внутрисердечные ганглии образованы холинергическими нервными клетками. В пределах ганглиозно-синаптического аппарата возбуждение, приходящее по преганглионарным парасимпатическим путям, подвергается дисперсированию. Постганглионарная природа эффектов парасимпатического происхождения и импульсной активности, регистрируемой во внутрисердечных путях при активации преганглионарных вагусных элементов, может быть выявлена с помощью ганглиоблокаторов. Исчезновение импульсации и эффекта после действия на сердце ганглиоблокатора свидетельствует о существовании в пределах сердца синаптического переключения; импульсация и эффект симпатического происхождения остаются при этом без изменений.

Цель работы. Исследовать регуляторные влияния на ритм и силу сердечных сокращений лягушки со стороны парасимпатического и симпатического отделов вегетативной нервной системы, а также со стороны смешанного вагосимпатического ствола в условиях электрической стимуляции этих нервных аппаратов. Сделать электрофизиологический анализ импульсной активности, возникающей во внутрисердечных нервах при активации экстракардиальных нервных элементов.

ПОДТЕМА 1. ИЗУЧЕНИЕ ПАРАСИМПАТИЧЕСКИХ И СИМПАТИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ВЛИЯНИЙ НА СИЛУ И ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ (РЕГИСТРАЦИЯ МЕХАНОГРАММЫ)

Цель работы. Проанализировать инотропные и хронотропные эффекты на сердце, возникающие при раздражении разными силами и разными частотами ядер вагуса в продолговатом мозгу, симпатической цепочки и общего вагосимпатического ствола.

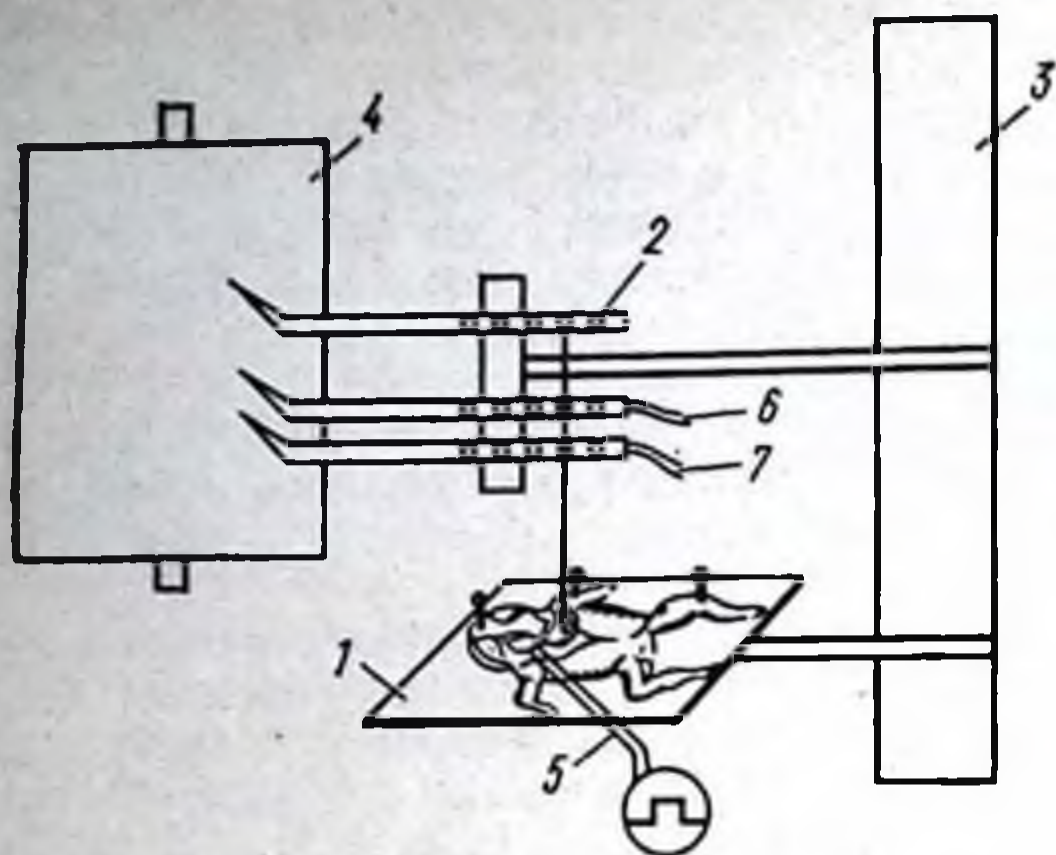


Рис. 129. Установка для регистрации механограммы сердца лягушки:

1 — препаровальная пластинка, 2 — рычажок Энгельмана, 3 — универсальный штатив, 4 — кимограф, 5 — раздражающие электроды (присоединяются к выходу стимулятора), 6, 7 — отметчики раздражения и времени

Методика. Основные приборы и оборудование. Регистрирующее устройство для записи механограммы сердца (кимограф); штатив универсальный; препаровальная восковая пластинка; электронный стимулятор ЭСЛ-1 или ЭСЛ-2; раздражающие биполярные проводочные электроды (диаметр проволоки 0,5 мм, межэлектродное расстояние 3 мм); серфин; рычажок Энгельмана; набор хирургических инструментов; отметчик раздражения; отметчик времени. Общий вид установки представлен на рис. 129.

Задача 1. Изучение парасимпатического влияния на сердце

Препаровка. 1. Лягушку обездвигивают разрушением спинного мозга (головной мозг остается интактным) и прикалывают к препаровальной пластинке вентральной стороной вверх.

2. Вскрывают грудобрюшную полость и обнажают сердце. Осторожно снимают перикард, перерезают уздечку. Закрепляют серфин на верхушке желудочка.

3. Переходят к препаровке продолговатого мозга. Отрезают нижнюю челюсть и обнажают крестовидную кость над вентральной частью продолговатого мозга. Прямыми остроконечными ножницами, ставя их перпендикулярно позвоночнику в области затылочного отверстия, делают надрез сначала вдоль позвоночного ствола, а затем вдоль крышки черепа. Осторожно скалывают (лучше щипцами) черепные кости с правой и левой стороны, а потом дужки позвонков. До начала раздражения закрывают поверхность мозга ватой, увлажненной раствором Рингера. При раздражении центров блуждающего нерва в продолговатом мозгу возбуждается гортанный нерв, вызывающий сокращение мышц, двигающих гортань лягушки. Этот нерв перерезают, так как его раздражение может отразиться на записи работы сердца. Перерезают также плечевой нерв.

4. По окончании препаровки пластинку с животным закрепляют в муфте штатива. Сердце прикрепляют к плечу псичика с помощью нитки, привязанной к серфину. Перед наложением раздражающих электродов поверхность продолговатого мозга слегка подсушивают кусочком фильтровальной бумаги. Кончики раздражающих электродов осторожно вводят в продолговатый мозг приблизительно в нижней его трети. Параметры раздражения: длительность стимула 0,3—0,5 мс, частота раздражения от 3 до

15 имп/с, величина стимула 2—15 В, длительность раздражения 3—4 с.

Ход работы. 1. Зарегистрировать исходную механограмму сердца. При частоте раздражения 10 имп/с нанести первое раздражение на продолговатый мозг напряжением 2 В (одновременно с включением раздражения на стимуляторе должно происходить замыкание цепи отсчетчика раздражения). Через 3—4 с прекратить раздражение и дождаться восстановления исходной формы механограммы. Так же наносят последующие раздражения, увеличивая при каждом очередном раздражении амплитуду стимула на 2—3 В. Увеличение силы раздражения продолжают до получения полной остановки сердца. Обычно это происходит уже после 3—4-го раздражения. В ходе опыта надо следить за тем, чтобы сердце не пересыхало (смачивать сердце раствором Рингера).

2. После восстановления нормальной механограммы произвести ряд регистраций деятельности сердца в условиях изменения частоты стимуляции продолговатого мозга при постоянной силе раздражения. С этой целью определить по данным 1-го опыта силу раздражения, вызывающую падение амплитуды сокращений примерно на 20%. 1-е раздражение нанести с частотой 1—2 имп/с, ряд последующих раздражений наносить, увеличивая каждый раз частоту стимуляции на 5—6 имп/с. Длительность раздражения в обоих случаях должна оставаться постоянной.

Задача 2. Изучение симпатического влияния на сердце

Препаровка. 1. Лягушку обездвигивают и отпрепаровывают сердце, как в задаче 1.

2. Осторожно отрезают нижнюю челюсть и обнажают крестовидную кость. Для препаровки симпатической цепочки рассекают небольшой верхний слой мышц, выходящих из-под крестовидной кости с соответствующей стороны; вблизи первых позвонков в виде тонкого серо-белого тяжа проходит симпатический ствол. Ствол осторожно приподнимают стеклянным крючком и кладут на электроды. Кусочком фильтровальной бумаги подсушивают область вокруг нервного ствола.

3. Параметры раздражения: длительность стимула 0,3—0,5 мс, частота от 5 до 15 имп/с, величина стимула 5—15 В, длительность раздражения 4—5 с.

Ход работы. 1. При постоянной частоте раздражения 15 имп/с исследовать изменения в симпатическом хронотропном и инотропном эффекте на сердце при изменении силы раздражения от 5 до 15 В, увеличивая при каждом последующем раздражении силу на 3—5 В.

2. После восстановления нормальной механограммы по окончании последнего раздражения провести исследование зависимости величины симпатического эффекта на сердце от частоты раздражения. По данным предыдущего опыта выбрать силу раздражения, вызывающую увеличение амплитуды сокращений примерно на 10%. Частоту раздражения менять от 5 до 15 имп/с, увеличивая

при каждом последующем раздражении частоту на 3—5 имп/с. Длительность раздражения в обоих случаях должна быть постоянной.

Задача 3. Изучение влияния на сердце раздражения общего вагосимпатического ствола

Препаровка. 1. Обездвиженную лягушку располагают вентральной стороной вверх на препаровальной пластинке. Отпрепаровывают сердце, как в задаче 1.

2. Для препаровки вагосимпатического ствола перерезают мышцы и фасции между углом верхней челюсти и сердцем до *m. petrohyoideus* a. На этой мышце ближе к нижнему краю нахо-

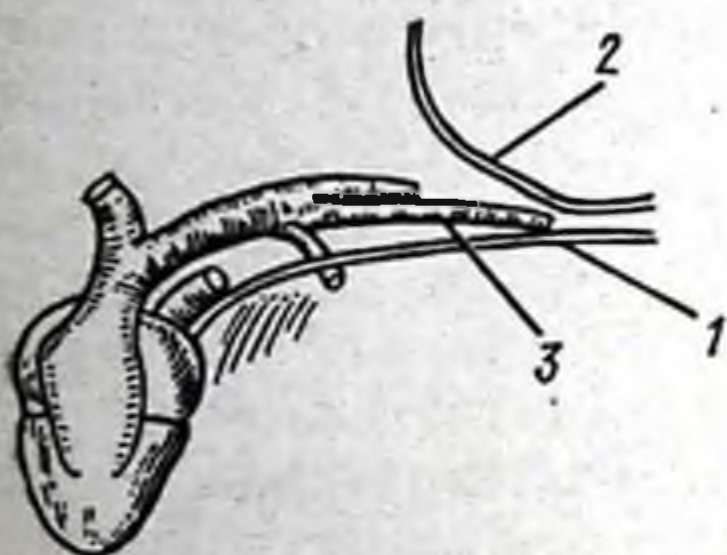


Рис. 130. Топография вагосимпатического ствола у лягушки (препаровка с вентральной стороны):

1 — вагосимпатический ствол, 2 — языкоглоточный нерв, 3 — средняя ветвь аорты

дится сосудисто-нервный пучок, состоящий из сонной артерии, яремной вены, гортанного и вагосимпатического нервов (рис. 130). Впереди располагаются два нервных ствола: подъязычный и языкоглоточный нервы. Первый из них перекрещивает сосудисто-нервный пучок, второй образует над ним петлю. Вагосимпатический ствол освобождают от окружающей ткани, приподнимая весь сосудисто-нервный пучок стеклянным крючком. Подъязычный и языкоглоточный нервы перерезают, под сосудисто-нервный пучок подводят лигатуру как можно дальше от сердца. Лигатуру завязывают и нервный ствол перерезают выше мес-

та перевязки. Периферический конец перерезанного вагосимпатического ствола помещают на раздражающие электроды. Дальнейшие этапы подготовки к опыту те же, что и в задачах 1 и 2.

3. Параметры раздражения: длительность стимула 0,3—0,5 мс, частота от 2—3 до 15 имп/с, величина стимула 2—15 В, длительность раздражения 4—5 с.

Ход работы. 1. Исследовать изменение эффекта на сердце в зависимости от раздражения общего вагосимпатического ствола при вариациях силы и частоты раздражения. Обратит внимание на появление положительного инотропного и хронотропного эффекта по окончании раздражения.

Обработка результатов. При сравнительном анализе механограмм деятельности сердца в задачах 1—3 обращают внимание на изменение хронотропных и инотропных показателей при активации соответствующих нервных аппаратов разными параметрами стимулов. Полученные данные выражают в процентах по отношению к норме и сводят в общую таблицу. Строят графики зависимости максимальной величины инотропного и хронотропного эффектов от параметров раздражения.

ПОДТЕМА 2. АНАЛИЗ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ВО ВНУТРИСЕРДЕЧНЫХ НЕРВАХ ЛЯГУШКИ ПРИ РАЗДРАЖЕНИИ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Цель работы. Зарегистрировать импульсную активность во внутрисердечных нервах при раздражении продолговатого мозга, симпатической цепочки и общего вагосимпатического ствола. Исследовать влияние на импульсную активность ганглиоблокатора.

Методика. Основные приборы и оборудование. Усилитель УБП2-03; электронный осциллограф С1-16, С1-18; регистрирующее устройство, позволяющее осущес-

ствлять регистрацию импульсных процессов — шлейфовый осциллограф или ФОР; стимулятор ЭСЛ-1, ЭСЛ-2; изолирующий трансформатор; экранирующая камера; раздражающие биполярные электроды из проволоки диаметром 0,5 мм с межэлектродным расстоянием 3 мм; отводящие (регистрирующие) электроды из серебряной проволоки диаметром 0,2 мм с межэлектродным расстоянием 2 мм; набор хирургических инструментов: рамка Граменицкого; чашка Петри; восковая пластинка с заземляющим электродом. Функциональная схема установки представлена на рис. 131.

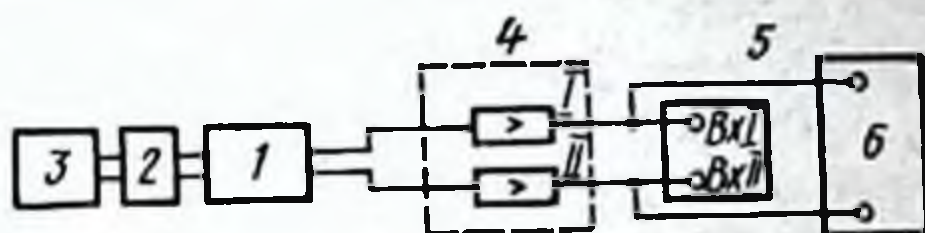


Рис. 131. Функциональная схема установки для регистрации импульсной активности от внутрисердечных нервов при раздражении экстракардиальных нервных путей:

1 — объект, 2 — изолирующий трансформатор, 3 — электронный стимулятор, 4 — дифференциальный усилитель биопотенциалов, 5 — электронный осциллограф, 6 — шлейфовый осциллограф; Вх — входы осциллографа

Препаровка. 1. Лягушку обездвиживают разрушением спинного мозга. Головной мозг сохраняют интактным. Животное прикалывают вентральной стороной вверх.

2. Вскрывают грудобрюшную полость, обнажая сердце. Снимают перикард, перерезают уздечку. Закрепляют серфин на верхушке желудочка. Приподнимают сердце за серфин и закрепляют его в приподнятом положении с помощью нити серфина и зонда.

3. Перевязывают нижнюю полую вену и перерезают ее дистальнее места перевязки. То же производят с дугами аорты. Свободные концы лигатур должны быть не менее 5 см.

4. Производят препаровку левого и правого вагосимпатических стволов, сохраняя их связь с продолговатым мозгом (ход препаровки см. в задаче 3 подтемы 1). Отпрепаровывают сердечные веточки вплоть до вхождения их в венозный синус сердца (они отчетливо видны на пленке, связывающей верхние полые вены с предсердиями).

6. Перевязывают и перерезают верхние полые вены ниже места перевязки. Осторожно опускают сердце на окружающие ткани и приступают к препаровке продолговатого мозга и симпатической цепочки (см. задачи 1, 2 подтемы 1).

7. После окончания препаровки сердце вновь приподнимают,

удаляют нижнюю часть туловища, а также передние конечности, сделав перерезку на 1 см каудальнее отпрепарованного продолговатого мозга. В окончательном виде на данном этапе препарат должен представлять собой верхнюю часть туловища с отпрепарованными продолговатым мозгом, симпатической цепочкой, вагосимпатическими стволами, подходящими к сердцу в виде двух тонких сердечных веточек, и с изолированным от организма сердцем.

8. Полученный препарат осторожно переносят в чашку Петри с раствором Рингера и рамкой Граменицкого.

9. Сердце растягивают на рамке Граменицкого с помощью свободных концов лигатур, наложенных на сосуды, и нити серфина, закрепленного за верхушку желудочка (см. рис. 117).

10. Осторожно вводят браншу ножниц в синоатриальное отверстие (обведено кружком на рис. 117) и вскрывают стенку предсердия по направлению к основанию желудочка. Делают разрезы стенки вправо и влево вдоль а-в борозды. После этого становится хорошо видной межпредсердная перегородка с идущими по ней внутрисердечными нервами.

11. Под межпредсердную перегородку подводят тонкую пластинку (2—3 мм толщиной) из оргстекла и переходят к препаровке одного из внутрисердечных нервов. Отпрепарованный нерв перевязывают тонкой лигатурой у места его вхождения в желудочек и перерезают ниже места перевязки. После этого удаляют желудочек, дуги аорты, перерезают все растягивающие лигатуры, снимают препарат с рамки Граменицкого и переносят в экранирующую камеру.

Задача 1. Регистрация импульсной активности во внутрисердечных путях при раздражении продолговатого мозга

Ход работы. 1. Поместить препарат на восковую пластинку в экранирующую камеру так, чтобы синусная область располагалась на заземленной серебряной пластинке, впаянной в восковую пластину. Раздражающие электроды осторожно ввести в структуры продолговатого мозга (см. задачу 1).

2. Поместить отпрепарованный внутрисердечный нерв на отводящие электроды (для уменьшения артефакта раздражения лигатура внутрисердечного нерва не должна касаться восковой пластинки). Смачивать внутрисердечный нерв периодически с помощью тонкой кисточки раствором Рингера.

3. Использовать один из каналов УБП2-03, на его калибраторе установить калибровочный импульс 50 мкВ. Перевести ручку «работа-калибровка» в положение «калибровка»¹. Добиться с помощью ручки усиления (грубое и плавное), чтобы на экране индикатора импульс в 50 мкВ соответствовал 1 см. Установить на эк-

¹ Во всех задачах настоящей подтемы до начала регистрации произвести запись калибровочного сигнала (50 мкВ).

ране осциллографа нужное усиление для проведения визуального контроля (в случае использования для регистрации шлейфовых осциллографов) или для регистрации с экрана импульсных процессов (при использовании ФОР). Скорость движения пленки в регистрирующем приборе должна быть не менее 100 мм/с. Установить верхнюю полосу пропускания на УБП исходя из того, что скорость нарастания переднего фронта импульса составляет порядка 200 мкс.

4. Перевести ручку «работа-калибровка» в положение «работа». Установить на стимуляторе необходимые параметры раздражения: длительность стимула 0,3—0,5 мс, частота 3—4 имп/с, напряжение 5—15 В; длительность отдельного раздражения не более 3—4 с.

5. На продолговатый мозг нанести несколько серий стимулов, постепенно увеличивая силу раздражения (не более 3—4 раздражений), и регистрировать изменения в импульсной активности, возникающей во внутрисердечных путях в ответ на стимуляцию продолговатого мозга.

Задача 2. Регистрация импульсной активности во внутрисердечных путях при раздражении симпатической цепочки

Ход работы. 1. Раздражающие электроды подвести под отпрепарованную симпатическую цепочку (см. задачу 1 этой подтемы). Перед началом опыта внутрисердечный нерв тщательно смочить и вновь поместить на отводящие электроды.

2. Параметры раздражения те же, что в задаче 1 этой подтемы, однако начинать раздражение следует, используя несколько большие стимулы (порядка 10 В).

3. Установив силу раздражения, необходимую для выявления залпа импульсов, зарегистрировать импульсную активность во внутрисердечном нерве. Нанести еще 2—3 серии стимулов, увеличивая каждый раз силу раздражения на 3—5 В. Записать изменения в импульсной активности во внутрисердечных путях.

Задача 3. Регистрация импульсной активности во внутрисердечных путях при раздражении общего вагосимпатического ствола

Ход работы. 1. Подвести лигатуры под отпрепарованные вагосимпатические стволы как можно дальше от сердца; перевязать их и перерезать выше места перевязки. Подняв один из нервных стволов за свободный конец лигатуры, поместить его на раздражающие электроды.

2. Параметры раздражения те же, что в задаче 1 этой подтемы. В случае отсутствия импульсной активности положить на раздражающие электроды 2-й вагосимпатический ствол.

3. Зарегистрировать изменения в импульсной активности во внутрисердечном нерве при вариаии силы раздражения вагосимпатического ствола (например, 5 В, 10 В, 15 В).

Задача 4. Влияние ганглиоблокатора на внутрисердечную активность, регистрируемую при раздражении парасимпатических и симпатических нервных путей

Ход работы. 1. По окончании предыдущих задач нанести на синусную область сердца несколько капель ганглиоблокатора (арфонад, 10^{-3} г/мл).

2. При последовательном повторении раздражений продолговатого мозга, симпатической цепочки и вагосимпатического ствола



стимулами, вызывающими по данным предыдущих задач импульсную активность наибольшей амплитуды, зарегистрировать во внутрисердечных путях изменения импульсной активности.

Обработка результатов. При сравнительном анализе ЭНГ, полученных в каждом опыте (рис. 132), обращают особое внимание на следующие показатели импульсной активности: латентность залпа (мс), максимальная амплитуда залпа (мкВ), длительность залпа (мс) и число импульсов в залпе. Для

Рис. 132. Электронейрограммы внутрисердечного нерва при одиночном раздражении экстракардиальных нервных аппаратов:

а — при раздражении продолговатого мозга, б — то же, симпатической цепочки, в — то же, вагосимпатического ствола; стрелками отмечены артефакты раздражения

анализа ЭНГ используют аппарат для чтения (типа «Микрофот»). Строят графики зависимости амплитуды и длительности залпа от силы раздражения к 1—3 задачам. В задаче 4 отмечают изменения в показателях импульсной активности после действия ганглиоблокатором.

Рекомендуемая литература: [31]; [44—46].

ТЕМА V. АВТОРЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ВНУТРИСЕРДЕЧНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Внутрисердечная нервная система представляет собой совокупность нервных сплетений и ганглиозных клеточных структур, расположенных в тканях сердца. С функцией внутрисердечной нервной системы как конечного звена экстракардиальной иннервации мы ознакомились в предыдущей теме. Однако ганглиозно-симпатические структуры внутрисердечной нервной системы участвуют и в про-

цессах саморегуляции сердца как периферический нервный аппарат, в котором происходит замыкание местных внутрисердечных рефлекторных дуг.

Под *внутрисердечными рефлексами* понимают рефлекторные взаимоотношения между отделами сердца, осуществляющиеся в пределах внутрисердечной нервной системы. Истинный периферический вегетативный рефлекс, в том числе и внутрисердечный, отличается от аксон-рефлекса тем, что функцию афферентного и эфферентного звена такого рефлекса выполняют два различных специализированных нейрона (афферентный и эфферентный), а не разветвления одного и того же нейрона, как при аксон-рефлекторных взаимоотношениях. Все звенья внутрисердечной рефлекторной дуги расположены в пределах сердца, поэтому возможность осуществления внутрисердечных рефлексов сохраняется после полной экстракардиальной денервации или трансплантации сердца и даже после изоляции сердца из организма.

Эфферентным звеном внутрисердечного рефлекса служат те же самые ганглиозные элементы, которые образуют постганглионарное звено экстракардиальных парасимпатических путей (клетки I-го типа по Догелю).

Афферентное звено внутрисердечного рефлекса представлено клетками II-го типа по Догелю. Эти клетки биполярны: один из отростков образует афферентное окончание в структурах сердца, другой — вступает в синаптический контакт с телом нейрона I-го типа (рис. 133).

Внутрисердечные рефлекторные механизмы могут участвовать в авторегуляции практически всех показателей функциональной активности сердца: частоты сердечбиений, силы сокращений отделов сердца, скорости и степени диастолического расслабления миокарда, процесса проведения возбуждения в сердце, скорости реполяризационных процессов. Адекватным стимулом для активации рецепторных структур, образованных отростками внутрисердечных афферентных нейронов, служит изменение степени растяжения стенок сердца, что имеет место при изменении величины венозного притока.

Наличие внутрисердечных рефлексов наряду с миогенными механизмами авторегуляции обеспечивает возможность адаптации функциональной активности сердца к физической активности у животных, полностью лишенных экстракардиальной иннервации в результате перерезки соответствующих нервных путей или при трансплантации сердца. Морфологические исследования показали, что даже через 141 день после пересадки в сердце собаки сохраняются интактные внутрисердечные рефлекторные пути. В сердце лягушки внутрисердечные взаимоотношения также удавалось выявить после полной дегенерации экстракардиальных нервных путей (перерезка экстракардиальных нервов за 35—40 дней до опыта).

В интактном организме экстракардиальные и внутрисердечные механизмы авторегуляции, видимо, функционируют как единый авторегуляторный аппарат, обеспечивающий адаптацию деятельности сердца к условиям меняющейся гемодинамики.

Цель работы. Выявить при искусственном раздражении внутрисердечных афферентных путей изолированного сердца потенциальные возможности авторегуляции при участии внутриоргана реффлекторного аппарата сердца.

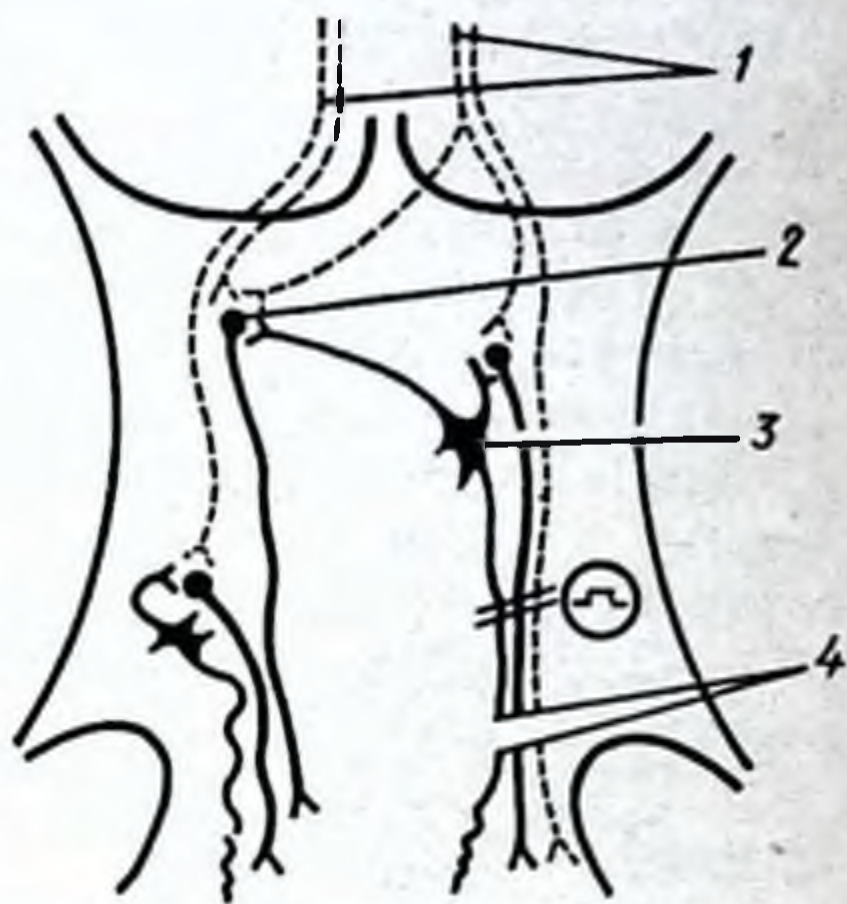


Рис. 133. Внутрисердечные рефлекторные пути и их взаимоотношения с экстракардиальной парасимпатической иннервацией:

1 — экстракардиальные нервы, 2 — эфферентный нейрон, 3 — афферентный нейрон, 4 — место перерезки перегородочного нерва

Задача. Изучение внутрисердечных рефлексов изолированного сердца в условиях искусственного раздражения внутрисердечных афферентных путей

Методика. Основные приборы и оборудование. Электрокардиограф с чернильной записью; электронный стимулятор; раздражающие биполярные проволочные электроды диаметром 0,2 мм и межэлектродным расстоянием 2,5—3 мм; отводящие фитильковые электроды; чашка Петри с рамкой Граменицкого; раствор ганглиоблокатора.

Препаровка. 1. Готовят препарат изолированного сердца лягушки так же, как в предыдущей задаче.

2. После обнажения межпредсердной перегородки осторожно отпрепаровывают оба перегородочных нерва: один по всей длине, другой так, чтобы под него можно было подвести лигатуру.

3. Полностью отпрепарованный перегородочный нерв перевязывают у места входа его в ткани желудочка и перерезают за лигатурой около желудочка.

4. Помещают центральный конец этого нерва на раздражающие электроды.

5. Подводят под второй перегородочный нерв лигатуру, не затягивая ее.

Ход работы. 1. Наладить регистрацию ЭГ так, чтобы хорошо были видны все основные зубцы и интервалы.

2. Сделать несколько регистраций эффекта от раздражения центрального конца перегородочного нерва. Включать запись за несколько сердечных циклов до начала раздражения и выключать после восстановления сердцебиений. Обратить внимание, чтобы при раздражении нерва происходили отчетливые изменения формы желудочкового комплекса ЭГ. Отсутствие изменений формы желудочкового комплекса указывает на то, что при препаровке был поврежден 2-й перегородочный нерв.

3. Перерезать 2-й (не раздражаемый) перегородочный нерв и повторить опыт с раздражением центрального конца 1-го нерва. Перерезку 2-го нерва делают для того, чтобы показать, что влияния на желудочек идут по этому нерву. После его перерезки влияния раздражения центрального конца 1-го перегородочного нерва на ритм сохраняются, но при этом не должно быть изменений формы желудочкового комплекса.

4. Нанести на область синоatriального узла несколько капель раствора ганглиоблокатора (арфонад, в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ г/мл).

5. Повторить через 2—3 мин раздражение нерва.

Обработка результатов. Сопоставляют эффекты, полученные до и после перерезки 2-го перегородочного нерва, до и после действия ганглиоблокатора.

Рекомендуемая литература: [6]; [17]; [44]; [48] — гл. 26.

ТЕМА VI. УЧАСТИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ НЕРВНЫХ ВЛИЯНИЙ НА СЕРДЦЕ

В основе нервного воздействия на различные эффекторные структуры, в том числе на сердце, лежит влияние на эти образования *медиаторов*, т. е. веществ, высвобождающихся из нервных окончаний при возбуждении нервов. Это положение было сформулировано основоположником медиаторной теории О. Леви.

Одним из основных экспериментов, положивших начало медиаторной теории, был опыт О. Леви, показавший, что при возбуждении экстракардиальных нервов в перфузате сердца лягушки появляются физиологически активные вещества, которые при переносе в перфузат другого сердца (реципиента) оказывают влияния, сходные с воздействиями соответствующих нервов. Согласно медиаторной теории, функциональная разнородность регуляторных воздействий парасимпатических и симпатических нервов, обнаруживаемая в экспериментах при их раздражении, определяется исключительно химической специфичностью медиаторов и соответствующих им рецепторов. Предполагают, что ацетилхолин, выделяющийся при возбуждении парасимпатических нервов, вызывает только торможение деятельности сердца, а учащение возникает исключительно за счет действия катехоламинов (норадреналин и адреналин), высвобождающихся при активации симпатических нервов.

Современные методы исследования подтвердили наличие в эффекторных структурах специализированных холино- и адренорецепторов, с которыми взаимодействуют соответствующие медиаторы. Эти рецепторы являются структурами белковой природы, встроенными в липопротеидную основу клеточных мембран. Освобождающийся в нервном окончании медиатор взаимодействует с рецепторами, образуя при этом комплекс медиатор-рецептор. Предполагают, что соединение медиатора с рецепторами является начальным звеном в цепи реакций, происходящих в клетке под влиянием нервных импульсов. Следствием взаимодействия медиатора с рецептором является изменение ионной проницаемости клеточной мембраны, активности клеточных ферментов и общего метаболизма клетки.

Опыты с гуморальным воспроизведением нейрогенных эффектов являются модельными экспериментами. Они предназначены только для выявления факта освобождения физиологически активных веществ при электрической стимуляции нервов и участия этих веществ в регуляторных воздействиях на эффекторные структуры сердца. Как правило, в этих экспериментах стараются «накопить» как можно больше медиаторного вещества, что достигается при длительном и достаточно сильном раздражении нервов. Поэтому действие перфузата в этом случае только в известной мере отражает эффекты на сердце, возникающие при сильном возбуждении нервов.

Цель работы. Воспроизвести опыты О. Леви и наблюдать так называемое явление «гуморального переноса» эффектов от раздражения симпатического и парасимпатического нервов.

Задача. Гуморальная передача нервных влияний с сердца-донора на сердце-реципиент

Методика. Основные приборы и оборудование. Кимограф; универсальный штатив; стеклянные канюли для перфузии сердца; рычажки Энгельмана; стимулятор ЭСЛ-1; металлические биполярные раздражающие электроды; отметчики времени и раздражения; набор хирургических инструментов; восковая пластинка.

Препаровка. Приготовление сердца-реципиента. 1. Обездвиживают лягушку разрушением спинного и головного мозга, обнажают сердце, снимают перикард.

2. Тщательно отпрепаровывают луковицу аорты, общий ствол и дуги аорты.

3. Подводят лигатуру под правую дугу аорты и перевязывают ее.

4. Подводят свободную (без перевязки) лигатуру под левую дугу аорты.

5. Подводят 2-ю свободную лигатуру под луковицу аорты.

6. Зацепив верхушку желудочка серфином с ниткой, закрепляют сердце в приподнятом положении, подвесив его к зонду или металлическим воротцам, вколотым в воск препаровальной ванночки.

7. Отпрепаровывают и перевязывают нижнюю полую вену и отсекают печень.

8. Тщательно отпрепаровывают и перевязывают отдельно обе верхние полые вены.

9. Перевязывают легочные вены при их схождении в одну (удобнее с дорсальной стороны).

10. Затягивают лигатуру, подведенную под левую дугу аорты вблизи места отхождения дуги от общего ствола, и в дальнейшем используют конец этой лигатуры для подтягивания дуги аорты при вставлении канюли.

11. Наливают в канюлю небольшое количество раствора Рингера, следя за тем, чтобы весь кончик канюли был заполнен.

12. Вводят кончик канюли в небольшой разрез, сделанный в стенке луковицы аорты. Канюля легче вставляется в фазу систолы, так как при этом клапаны луковицы аорты открыты. Введенный кончик канюли направляют внутрь желудочка. Показателем того, что кончик находится в желудочке, является фонтанчик крови, появляющийся в перфузате при каждой систоле желудочка.

13. Закрепляют сердце на канюле лигатурой, подведенной ранее под луковицу аорты, затянув лигатуру на уровне шейки канюли.

14. Изолируют сердце, перерезав все перевязанные сосуды дистальнее места наложения лигатур. Эту перерезку удобнее производить, слегка приподняв канюлю.

15. Промывают сердце, сменив перфузат в канюле несколько раз.

16. Зажимают канюлю в химической лапке, закрепленной в универсальном штативе. На время регистрации механограммы соединяют верхушку сердца с записывающим рычажком. Во избежание подсыхания поверхности сердца время от времени его орошают раствором Рингера.

Приготовление сердца-донора. 1. Обездвиживают лягушку, разрушив нижнюю часть спинного мозга через разрез позвоночника на уровне верхних конечностей.

2. Прикалывают лягушку вентральной стороной вверх и удаляют нижнюю челюсть.

3. С помощью глазных ножниц и пинцета снимают крестовидную кость над вентральной стороной продолговатого мозга (чтобы из-

бежать повреждения мозга, удаляют крестовидную кость маленькими участками, прижимая браншу ножниц к внутренней стороне кости). До начала раздражения закрывают поверхность мозга ватой, увлажненной раствором Рингера, а перед раздражением подсушивают кусочками фильтровальной бумаги.

4. Рассекают небольшой верхний слой мышц, выходящих из-под крестовидной кости с соответствующей стороны, и обнаруживают симпатическую цепочку, проходящую вблизи первых позвонков в виде тонкого серо-белого тяжа.

5. Осторожно приподнимают ствол стеклянным крючком и кладут на электроды.

6. Снимают перикард, отпрепаровывают все сосуды и накладывают на них лигатуры так же, как при приготовлении сердца-реципиента. Исключение составляют верхние полые вены, остающиеся интактными: их не следует брать на лигатуры и перевязывать, так как вблизи этих вен проходят сердечные ветви вагосимпатических стволов.

7. Вставляют канюлю в сердце через луковицу аорты и закрепляют сердце на канюле.

8. Удаляют всю часть туловища ниже перерезки спинного мозга, а верхнюю часть закрепляют на небольшой пробковой пластинке, стержень которой закреплен на муфте штатива.

Ход работы. 1. Оба сердца — реципиент и донор — соединить с рычажками Энгельмана и регистрировать одновременно деятельность двух сердец на кимографе (рис. 134). Установить концы рычажков, прикасающиеся к барабану кимографа, так, чтобы они находились на одной вертикали. Это делает возможным сопоставление механограмм обоих сердец в пределах одного и того же отрезка времени.

2. Поддерживать уровень растворов в каждой из канюль в течение всего опыта постоянным. Это исключает возможность изменения силы сокращения сердца за счет различной степени растяжения миокарда.

3. Для лучшего выявления эффекта гуморальной передачи в канюлю наливать небольшие количества перфузата, а продолговатый мозг или симпатический ствол раздражать относительно длительно. Примерные параметры раздражения: частота раздражения 15—20 имп/с, длительность импульса 0,5 мс, сила раздражения 3—5 В, длительность раздражения не менее 0,5—1 мин.

4. В конце раздражения при четком развитии эффекта на серд-

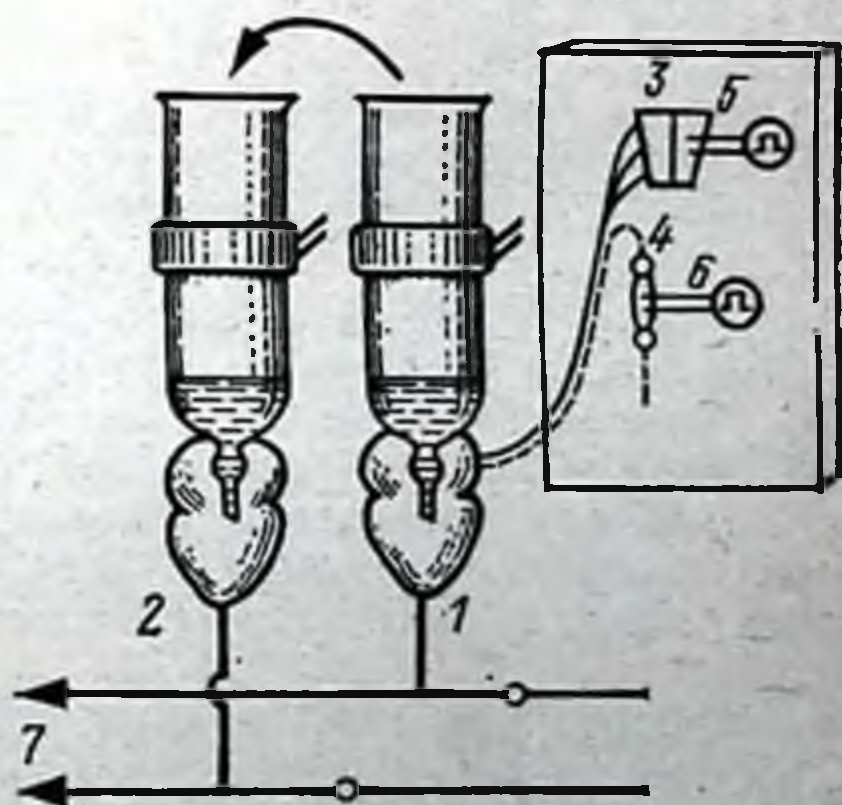


Рис. 134. Установка для изучения гуморальной передачи нервных влияний с сердца-донора (1) на сердце-реципиент (2):

3 — продолговатый мозг, 4 — симпатический ствол, 5, 6 — раздражающие электроды, 7 — рычажки Энгельмана

це-доноре перфузат в канюле этого сердца перемешать и перенести пипеткой в канюлю сердца-реципиента, из которой предварительно удалить раствор Рингера. Через некоторое время на механограмме сердца-реципиента должен появиться эффект гуморальной передачи в результате воздействия физиологически активного вещества, образовавшегося в сердце-доноре при возбуждении экстракардиальных нервов.

5. После предварительного отмывания обоих сердец чистым раствором Рингера повторить раздражение экстракардиальных нервов и перенос перфузата.

6. Провести контрольный эксперимент, перенося перфузат из сердца-донора в сердце-реципиент без раздражения экстракардиальных структур. Убедиться в отсутствии эффекта гуморальной передачи на сердце-реципиенте.

7. Отмечать на механограмме моменты взятия перфузата из канюли сердца-донора и введения его в канюлю сердца-реципиента. Одновременно с механограммой сердца регистрировать отметку времени и раздражения¹.

Обработка результатов. Сопоставляют механограммы сердца-донора и сердца-реципиента. Отмечают особенности развития торможения и усиления деятельности сердца при гуморальной передаче за счет действия медиаторов по сравнению с развитием тех же эффектов при нервных импульсно-медиаторных воздействиях.

Рекомендуемая литература: [20] — гл. 8—11; [40] — гл. 7; [44] — гл. 4; [48] — гл. 20, 21.

ТЕМА VII. КАРДИО-КАРДИАЛЬНЫЕ РЕФЛЕКСЫ

Сердце, будучи центральным пунктом схождения венозных притоков и расхождения артериальных путей, является органом, от которого ЦНС получает сведения об интенсивности общей гемодинамики, выраженной в изменении венозного притока, а также о необходимой силе и частоте сокращений сердца, способных обеспечить нужный минутный объем выбрасываемой крови. Занимая центральное положение в системе кровообращения, сердце является важнейшей рефлексогенной зоной. Особенно большое значение имеют механорецепторные образования венозных приемников сердца, реагирующие на растяжение тканей миокарда при увеличении венозного притока. Венозный приток к сердцу в известной мере служит показателем сдвигов в периферическом кровотоке во всем организме и в силу этого косвенно отражает интенсивность и уровень обмена веществ.

Афферентная сигнализация от рефлексогенной зоны сердца обуславливает совокупность влияний на сердечно-сосудистую систему, дыхание, почки и другие

¹ Вместо двух однорогих канюль может быть использована одна двурогая; тогда оба сердца имеют общий перфузат. Эффект гуморальной передачи на сердце-реципиент выявляется по мере перехода медиатора в перфузат при раздражении экстракардиальных нервов сердца-донора.

органы. Все рефлекторные механизмы, активирующиеся вследствие возбуждения рецепторов сердца, имеют жизненно важное значение. Однако для адаптивной регуляции кровотока особенно важны *кардио-кардиальные рефлексы*, приводящие к изменениям ритма и силы сокращения сердца; в процессе этой рефлекторной деятельности обеспечивается трофика миокарда, регулируется внутрипредсердное проведение и, вероятно, приспособительно меняется функциональная организация сердца. Кардио-кардиальные рефлексы — основная форма регуляции гемодинамической производительности сердца.

В условиях рефлекторной саморегуляции сердце является и рецепторным полем, и конечной эффекторной структурой, на которую воздействует эфферентная импульсация (рис. 135). Для изучения нервного аппарата кардио-кардиальных рефлексов сердца используют физиологически адекватные формы стимуляции рецепторов и прежде всего активацию механорецепторов предсердий, что имитирует возбуждение рецепторов при изменениях венозного притока. При рефлексах с венозных приемников сердца в первую очередь меняется ритм сердцебиений, являющийся основным фактором, определяющим гемодинамическую производительность сердца.

Впервые рефлексы с правого предсердия описал Ф. Бейнбридж, обнаруживший нейрогенное повышение частоты сердцебиений при введении в правое предсердие сердца собаки физиологического раствора или дефибринированной крови. Позднее было показано, что рефлексы с правого предсердия могут выражаться и в учащении, и в урежении деятельности сердца.

Кардио-кардиальные рефлексы, возникающие в ответ на возрастание венозного притока, могут быть обусловлены тремя основными механизмами адаптивной саморегуляции сердца: центральнорефлекторным, внутрисердечным рефлекторным и внутрисердечным миогенным.

Центральнорефлекторный механизм имеет в основном парасимпатическую природу и поэтому кардио-кардиальные рефлексы с участием ЦНС осуществляются и в тех случаях, когда сердце десимпатизировано, хотя симпатическая нервная система может принимать участие в осуществлении кардио-кардиальных рефлексов.

Внутрисердечные адаптивные кардио-кардиальные рефлексы осуществляются с участием внутрисердечной нервной системы, в отличие от центральнорефлекторных эффектов они обусловлены исключительно парасимпатическим механизмом.

Эффекты на сердце возникают и за счет непосредственного механического действия кровотока на ткань пейсмекера. Наличие внутрисердечных механизмов адаптивной саморегуляции сердца объясняет тот факт, что изменение ритма сердца в ответ на наполнение предсердий может происходить и после того, как сердце денервировано в результате перерезки экстракардиальных нервов.

При кардио-кардиальных рефлексах в ответ на увеличение венозного притока к сердцу наряду с изменением частоты сердцебиений адаптивно меняются и другие показатели функционального состояния сердца, в том числе скорость и степень диастолического расслабления миокарда и, соответственно, скорость диастолического наполнения сердца.

Цель работы. Исследовать сердце как рефлексогенную зону, с которой возникают различные изменения в его деятельности.

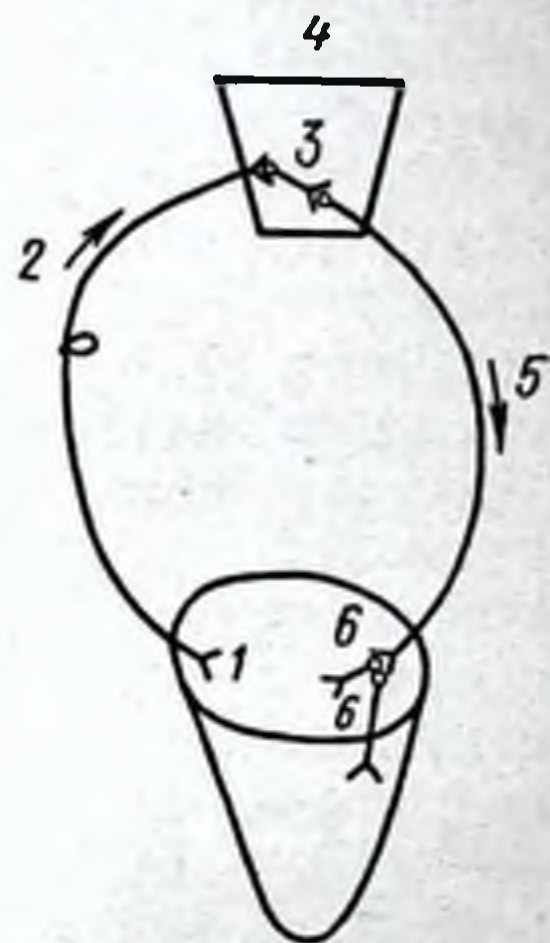


Рис. 135. Рефлекторная дуга при парасимпатических кардио-кардиальных рефлексах:

1 — рецепторное окончание, 2 — афферентное волокно, 3 — промежуточный нейрон, 4 — продолговатый мозг, 5 — эфферентный преганглионарный нейрон блуждающего нерва, 6 — эфферентный постганглионарный нейрон блуждающего нерва

З а д а ч а. Изучение природы хронотропных эффектов на сердце при растяжении правого предсердия

Методика. Основные приборы и оборудование. Кимограф¹; универсальный штатив; рычажок Энгельмана; канюля с резиновым баллончиком на конце, два шприца на 1 мл; источник постоянного тока для отметки раздражения; отметчик раздражения; отметчик времени; корковая пластинка; набор хирургических инструментов.

Препаровка. 1. Лягушку с интактной нервной системой (не обездвиженную) укрепляют на корковой пластинке с помощью марлевых петель на конечностях, вентральной стороной вверх. Для четкого выявления кардио-кардиальных рефлексов последующую препаровку ведут с минимальной кровопотерей так, чтобы во время опыта сердце не было обескровлено.

2. Проводят двустороннюю десимпатизацию сердца путем перерезки симпатических стволов с обеих сторон между вторым и третьим симпатическими ганглиями с удалением одного или двух ганглиев. Для проведения десимпатизации верхнюю челюсть закрепляют на пластинке булавкой, нижнюю — оттягивают ниткой. Делают разрез мягкого неба по средней линии. Рассекают мышцы, выходящие из-под крестовидной кости. Находят симпатические стволы, проходящие по обе стороны от позвоночника в виде тонких серо-белых тяжей. С помощью стеклянного крючка приподнимают симпатические стволы и перерезают с обеих сторон; иссекают ганглии. Сохраняют проходящие рядом кровеносные сосуды и главным образом подключичную артерию, проходящую через петлю Вьессена, между вторым и третьим симпатическими ганглиями.

3. Через 15—20 мин после десимпатизации разрезают кожу и плечевой пояс по средней линии. Вскрывают грудобрюшную полость, обнажают сердце и освобождают его от перикарда.

4. Приподнимают сердце за верхушку с помощью серфина и отпрепаровывают с обеих сторон сердечные ветви вагосимпатических стволов (рис. 136). Для препаровки ветвей поднимают лопасть печени и перерезают тканевую пленку между печенью и верхней полую вену соответствующей стороны, затем отводят в сторону легкое этой стороны, закрыв его булавкой за верхушку (для избежания кровотечения на верхушку легкого наложить тонкую лигатуру) и перерезают верх-



Рис. 136. Препаровка сердечных ветвей (2) вагосимпатического ствола (1) у лягушки:

3 — легочная ветвь, 4, 5 — верхняя и нижняя полые вены, 6 — венозный синус, 7 — правое предсердие, 8 — луковица аорты, 9 — легкое, 10 — лопасть печени

¹ Вместо записи механической активности сердца можно регистрировать электрическую активность. В этом случае вместо кимографа необходимы электрокардиограф и электроды для регистрации ЭКГ.

ную тканевую пленку между легким и верхней полую вену. В нижней пленке между легким и верхней полую вену проходит сердечная ветвь вагосимпатического ствола. Отпрепаровывают сердечные ветви с левой и правой сторон, особенно аккуратно отделяя их от верхних полых вен, и подводят под них лигатуры, не затягивая последние.

5. Подводят две лигатуры под правую верхнюю полую вену и одной из них перевязывают вену, по возможности дальше от сердца. Делают разрез в стенке вены, в области ее вхождения в сердце.

6. Вводят через этот разрез в правое предсердие небольшую канюлю (лучше полиэтиленовую) с баллончиком на конце, предварительно заполненную раствором Рингера. Баллончик представляет собой резиновый пузырек, сделанный из тонкой эластичной резины, насаженный на узкий кончик полиэтиленовой канюли. Закрепив вену на канюле 2-й лигатурой, укрепляют канюлю на корковой пластинке пластилином и соединяют свободный конец канюли через тонкую резиновую трубку со шприцем.

7. Отлаживают регистрацию деятельности сердца на кимографе, обязательно записывая отметку времени и раздражения: для отметки раздражения используют контактную кнопку, расположенную на поршне шприца. При нажатии на кнопку в момент введения раствора происходит замыкание электрической цепи.

Ход работы. 1. Зарегистрировать изменения ритма сердечной деятельности при различных степенях раздражающего воздействия. Раздувать баллончик, вводя в его полость различные количества раствора Рингера (от 0,02 до 0,25 мл); при этом происходит растяжение стенок предсердия и раздражение механорецепторов сердца¹. Начинать опыт нужно с введения меньших объемов раствора, постепенно переходя к большим так, чтобы при каждом последующем введении количество вводимой жидкости увеличивалось примерно на 0,03 мл. При хорошем кровонаполнении сердца после прекращения введения баллончик будет спадаться автоматически; если баллончик не спадается, необходимо вывести введенный объем жидкости.

2. Выключить центральнорефлекторный механизм кардио-кардиальных рефлексов. Для этого перерезать с двух сторон сердечные ветви экстракардиальных нервов, приподняв их с помощью заранее подведенных лигатур. Повторить растяжение предсердия с той же градацией количества вводимого раствора.

3. Выключить внутрисердечный нервный механизм кардио-кардиальных рефлексов. С этой целью 2-м шприцем с тонкой иглой ввести в полость желудочка ганглиоблокатор (пентамин или гексоний 0,25—0,5 мл 5%-ного раствора, или арфонад 0,25—0,5 мл 1%-ного раствора). Повторить через 5 мин дозированные введения раствора, регистрируя механограмму сердца.

¹ Активацию механорецепторов предсердия можно вызвать и при введении в сердце дополнительного объема крови или раствора Рингера. В этом случае в сердце вводить канюлю без баллончика на конце, вводимые объемы раствора 0,02—0,4 мл.

Обработка результатов. Отмечают зависимость эффекта на сердце от степени растяжения стенок правого предсердия. Сопоставляют эффекты на сердце до и после денервации и отмечают их особенности. Объясняют причину возможного изменения ритма сердцебиений после действия на сердце ганглиоблокатора. В случае использования электрокардиографа проводят анализ электрокардиограмм.

Рекомендуемая литература: [14]; [19] — с. 13—19; [44] — с. 102—133; [48] — с. 435—463.

ТЕМА VIII. ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА И РОЛИ АФФЕРЕНТНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В РЕФЛЕКТОРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СЕРДЦА

Сердце — наиболее богатый рецепторами орган. Его рецепторные приборы представляют собой некапсулированные чувствительные окончания биполярных нервных клеток; аксоны одной части этих клеток направляются в спинной мозг, другой — в продолговатый мозг. Первые нейроны называют *спинальными афферентами*, вторые — *медуллярными*. Клеточные тела спинальных нейронов располагаются в двух нижних шейных и верхних шести-семи грудных спинальных ганглиях (спинно-мозговых узлах). Клеточные тела медуллярных нейронов локализованы в узловатом и яремном ганглиях. Помимо этого в сердце имеются рецепторно-афферентные образования внутриорганных назначения — клетки II типа по Догелю.

В пределах сердца обнаружены механорецепторы и хеморецепторы. Механорецепторы сигнализируют о сокращении миокарда, реагируют на наполнение венозных приемников сердца кровью. Функциональная роль рецепторов сердца определяется их локализацией.

В наиболее общем виде рецепторная система сердца может быть разделена на зону «входа» (венозные приемники сердца, предсердия) и «выхода» (желудочки).

Афферентная сигнализация от зоны «входа» информирует ЦНС не только

о работе самого сердца, но и об интенсивности общей гемодинамики. Выявлено четыре типа залпов предсердных механорецепторов (рис. 137).

Залп А, совпадающий с волной «а» предсердного давления и интервалом *P—R* ЭКГ, синхронен систолическому подъему давления в предсердиях. В связи с тем, что не всегда наблюдается прямая зависимость между числом и частотой импульсов в залпе и амплитудой волны «а» предсердного давления, предполагают, что этот залп информирует ЦНС только о периодике предсердного давления, а не о величине этих изменений. Залпом, несущим сигнализацию об изменениях давления, является *залп В*. Он совпадает с нисходящим коленом волны «с» и волной «v» предсердного давления и синхронен интервалу

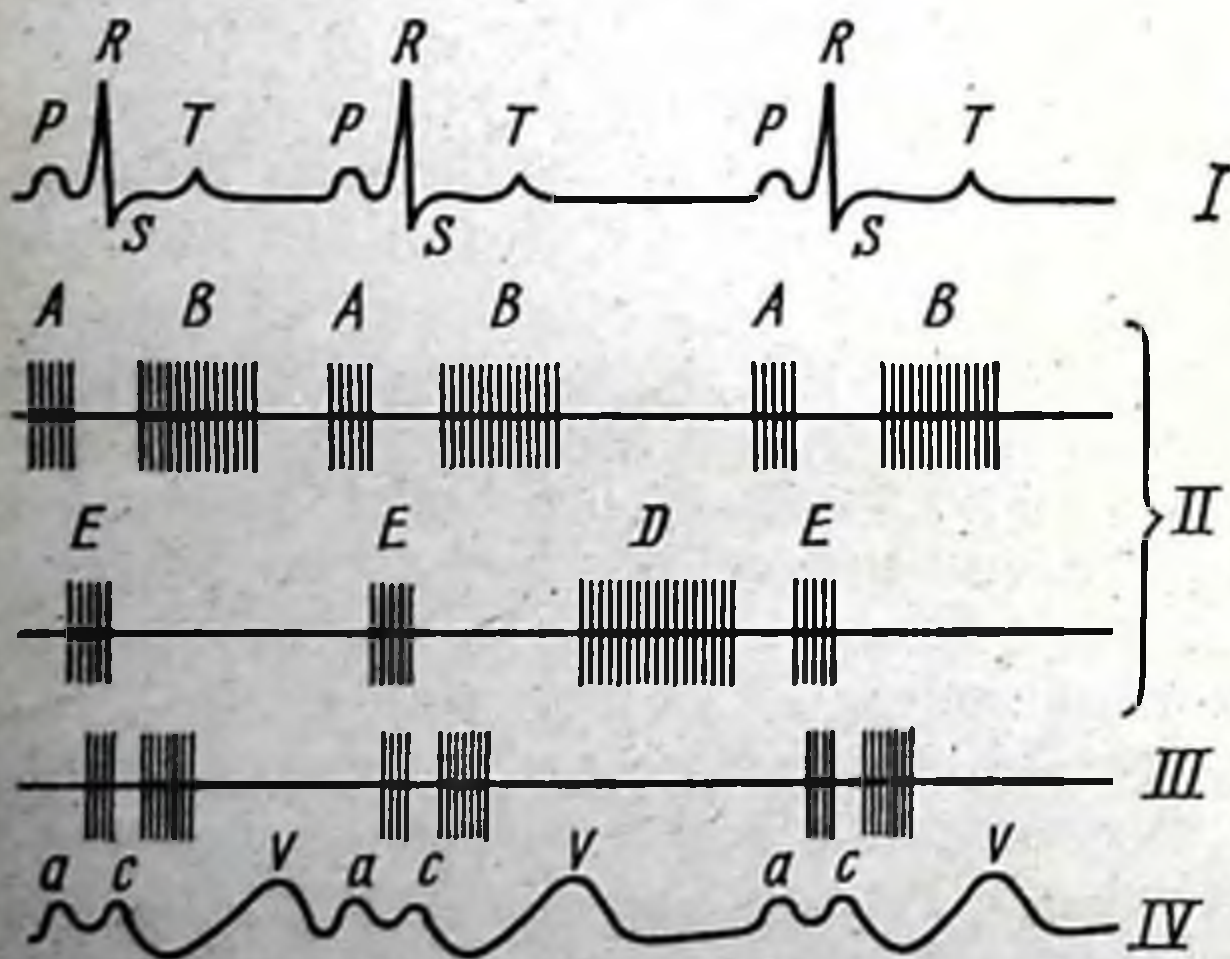


Рис. 137. Основные залпы афферентной активности от предсердных (II) и желудочковых (III) механорецепторов в блуждающем нерве кошки, их соотношение с ЭКГ (I) и внутрипредсердным давлением (IV):

А, В, D, Е — типы залпов

S—T ЭКГ. Число и частота импульсов в залпе прямо пропорциональны величине диастолического наполнения предсердий. При значительном урежении сердцебиений и, следовательно, при затяжной диастоле, появляется залп D. Он регистрируется между концом зубца T и зубцом P ЭКГ и соответствует волне диастолического наполнения. Сразу же после зубца K возникает ранний систолический залп — залп E. По времени он соответствует систоле желудочков и залпу от желудочковых механорецепторов. Разные типы залпов обусловлены различной локализацией однотипных рецепторов.

Активность механорецепторов предсердий млекопитающих животных, вероятно, представляет основную сигнализацию от сердца, с которой связана его рефлекторная регуляция при протекании кардио-кардиальных рефлексов. При изменении гемодинамики и, в первую очередь, венозного притока, обуславливающего возникновение кардио-кардиальных рефлексов, происходит увеличение частоты импульсации в залпе и длительности залпов, появление дополнительных залпов с сердечной периодикой, а при значительном возрастании венозного притока может произойти и полное слияние залпов в сплошную импульсацию. Последнее, очевидно, имеет место при чрезвычайных обстоятельствах и патологических условиях.

В соответствии с афферентными залпами, возникающими в разные фазы сердечного цикла и отличающимися в своей организации при различных вариациях гемодинамики, могут возникать и различия в рефлекторных реакциях сердца. Рецепторная зона желудочков вместе с аортальной и синокаротидной зонами млекопитающих образуют зону «выхода». Афферентная импульсация от этой зоны сигнализирует как о работе самого сердца, так и об общем сопротивлении артериального русла. В отличие от зоны «входа», представленной в основном многочисленными механорецепторами, число их в желудочках относительно невелико.

Активность механорецепторов желудочков млекопитающих, которая в соответствии с незначительным количеством механорецепторов регистрируется относительно редко, выражается в виде двух залпов. Первый — короткий, синхронный систоле желудочков, по времени возникает между зубцами R и S ЭКГ. Второй — поздний, систолический залп имеет пик частоты в конце зубца T и часто отсутствует, но всегда выявляется при внутривенном вливании.

Афферентная сигнализация от рецепторов сердца млекопитающих животных проводится по различным нервным волокнам — A, B и C, со скоростью проведения, значительно отличающейся друг от друга. Если в волокнах типа A она достигает 65 м/с, то в немиелинизированных волокнах типа C она меньше 1 м/с. Большинство афферентных волокон, по которым проводится сигнализация от механорецепторов сердца, это миелинизированные волокна с большой скоростью проведения — типы A и B.

Считают, что у млекопитающих животных афферентная сигнализация идет и по спинальным нервам. Однако предполагают, что эта сигнализация приобретает информационное значение только при значительных повышениях внутрисердечного давления, тогда как при нормальном давлении эта сигнализация, видимо, решающего значения в регуляции сердца не имеет.

В процессе филогенеза происходит постепенное формирование рефлексогенной зоны сердца. У рыб роль сердца как рефлексогенной зоны крайне незначительна. Основное значение в регуляции сердца у них имеет рефлексогенная зона жаберных сосудов, которую по аналогии с млекопитающими можно рассматривать как зону «выхода» сердца. У амфибий зона «выхода» также превалирует над зоной «входа», но последняя приобретает большое значение в рефлекторной регуляции сердца; зону «выхода» у амфибий в основном связывают с рецепторами желудочка.

Так как механорецепторы сердца лягушек расположены преимущественно в желудочке, при записи биоэлектрической активности от сердечной ветви вагосимпатического ствола чаще всего регистрируется активность желудочковых механорецепторов (рис. 138, III).

Принадлежность регистрируемых залпов к предсердным или желудочковым рецепторам устанавливают в экспериментах с гемодинамическими пробами (пережатие аорты, легочных сосудов, вторая лигатура Станниуса, избирательное растяжение предсердий или желудочка и т. д.), вызывающих преимущественное

увеличение давления и соответственно растяжение тканей предсердий или желудочка (рис. 139).

Желудочковые механорецепторы сердца лягушки показывают два залпа активности, один из которых возникает во время изометрической фазы сокращения желудочка (интервал $S-T$ ЭКГ), второй — во время изометрического расслабления (интервал $T-P$ ЭКГ). Активность механорецепторов предсердий в соответствии с их относительной малочисленностью регистрируется реже. Однако они также показывают два залпа активности — один во время систолы (интервал $P-R$ ЭКГ), второй во время диастолы (интервал $S-T$ ЭКГ). Предсердные рецепторы несут постоянную сигнализацию в ЦНС о величине венозного притока и о силе сокращений предсердий (см. рис. 138, II).

В ответ на информацию о состоянии и деятельности сердца в нервных центрах, регулирующих сердечно-сосуд-

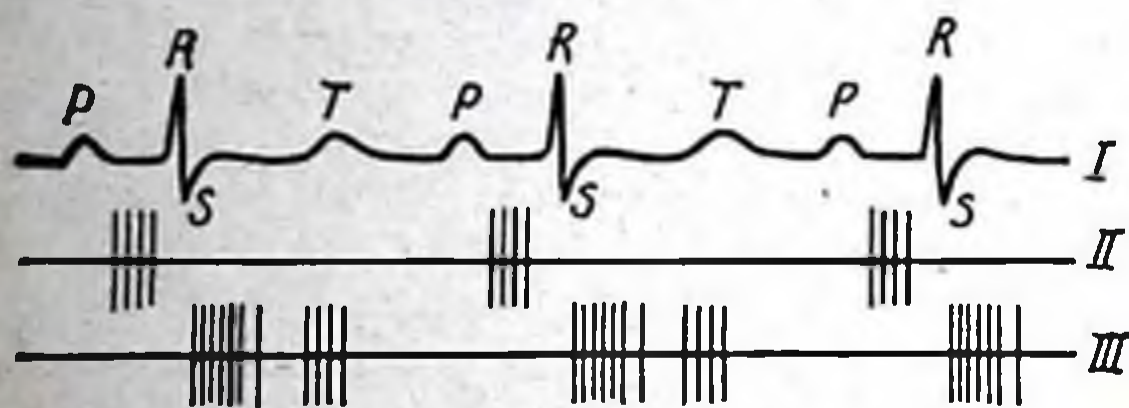


Рис. 138. Основные залпы афферентной активности от предсердных (II) и желудочковых (III) механорецепторов в сердечных ветвях вагосимпатических стволов лягушки и их соотношение с ЭКГ (I)

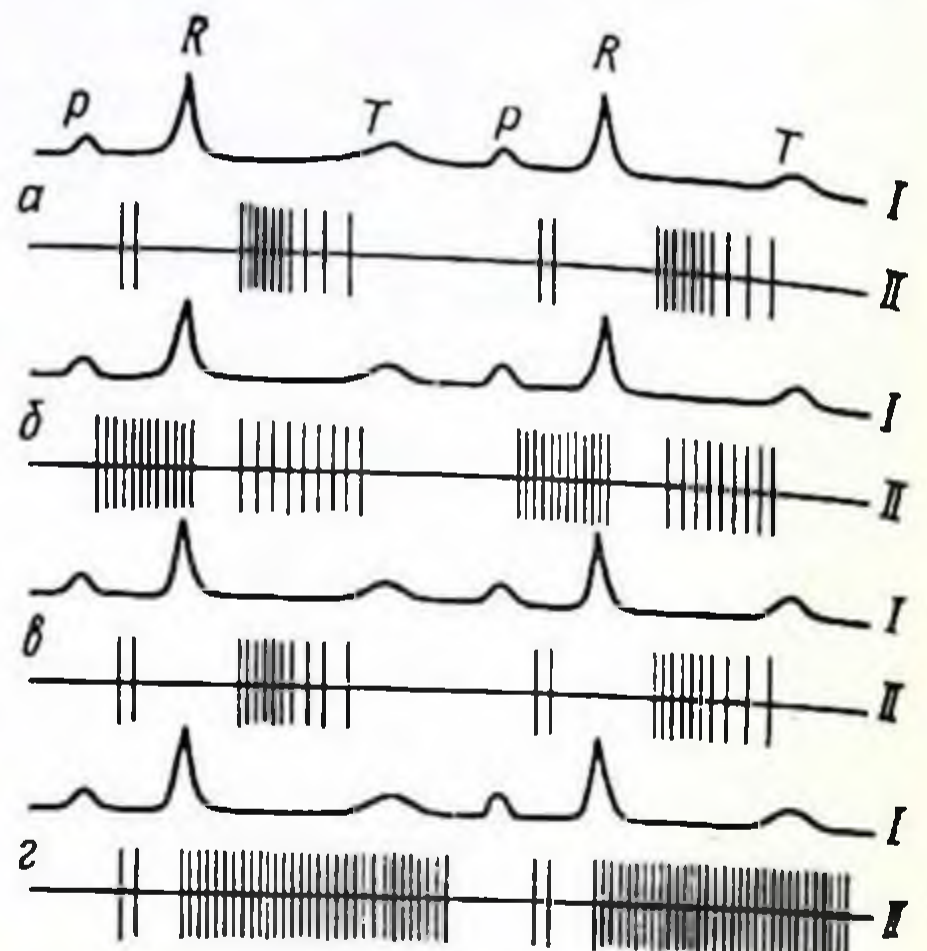


Рис. 139. Изменение афферентных залпов в сердечных ветвях вагосимпатических стволов лягушки при ряде гемодинамических проб:

I — ЭКГ, II — ЭНГ; а, б — исходная запись, б — на фоне II лигатуры Станниуса, г — на фоне пережатия дуг аорты

дистую систему, возникает эфферентная импульсация, достигающая эффекторных структур сердца. Таким образом, в условиях кардио-кардиальной регуляции сердце является и рецепторным полем и конечной эффекторной структурой, на которую воздействует эфферентная импульсация центрального нервного механизма.

Цель работы. Изучить афферентную активность в сердечных ветвях вагосимпатических стволов лягушки (подтема 1) и исследовать роль разных типов афферентных залпов в рефлекторной регуляции сердца (подтема 2).

ПОДТЕМА 1. ИЗУЧЕНИЕ ТИПОВ АФФЕРЕНТНЫХ ЗАЛПОВ В СЕРДЕЧНЫХ ВЕТВЯХ ВАГОСИМПАТИЧЕСКИХ СТОЛОВ ЛЯГУШЕК

Методика. Основные приборы и оборудование. Усилитель УБП-2-03; регистрирующее устройство, позволяющее осуществлять непрерывную регистрацию нескольких процессов типа шлейфового осциллографа Н-107; осциллограф типа С1-16; экранирующая камера; отводящие проволочные биполярные серебряные или платиновые электроды; устройство для введения жидкости в предсердие; корковая пластинка; набор хирургических инструмен-

тов; цепь для отметки раздражения; электроды для регистрации ЭКГ и ЭГ.

Препаровка. 1. Укрепляют лягушку вентральной стороной вверх с помощью марлевых петель на корковой пластинке. Для 1-й задачи лягушку предварительно обездвиживают разрушением спинного и головного мозга; для 2-й задачи необходима сохранность головного мозга.

2. Разрезают кожу, вскрывают грудобрюшную полость и освобождают сердце от перикарда. Точно по средней линии разрезают плечевой пояс. Стараются минимально повреждать сосуды. У самки удаляют икру, предварительно перевязав кровеносные сосуды.

3. Приподнимают сердце за верхушку желудочка с помощью серфина или лигатуры и отпрепаровывают с правой стороны сердечную веточку вагосимпатического ствола, как это указано для темы VII.

4. Отделяют веточку от верхней полую вены, тщательно освобождают ее от окружающей пленки, подводят под нее очень тонкую шелковую лигатуру, предварительно смоченную раствором Рингера, и перевязывают как можно дальше от сердца.

5. Перерезают веточку дистальнее места перевязки.

6. Для выполнения 2-й задачи у необездвиженной лягушки подводят две лигатуры под правую верхнюю полую вену и одной лигатурой перевязывают вену как можно дальше от сердца. 2-ю лигатуру подводят по возможности ближе к сердцу, делают петлю и вставляют через нее в сердце катетер или иглу с напаянным около кончика бугорком. Перевязывают сердце или верхнюю полую вену так, чтобы кончик катетера или часть иглы с бугорком находились в полости предсердия. Предварительно катетер или игла должны быть соединены полиэтиленовой или резиновой трубкой со шприцем, заполненным раствором Рингера с гепарином для предотвращения свертывания крови (0,5 мл или 2500 МЕ гепарина на 1 л раствора). Катетер или иглу укрепляют на корковой пластинке пластилином так, чтобы нормально осуществлялось введение раствора в предсердие и последующее отсасывание объема крови, равного введенному количеству.

7. Налаживают одновременную регистрацию деятельности сердца в виде записи ЭГ или ЭКГ и запись ЭНГ периферического конца сердечной веточки. Регистрация ЭКГ и ЭНГ осуществляется на осциллографе Н-107 с помощью УБП. I канал усилителя (рис. 140) используют для регистрации ЭНГ, II канал — для регистрации ЭКГ или ЭГ сердца. Ручки на обоих каналах «работа-калибровка» находятся в положении «калибровка». Учитывая разные временные характеристики ЭКГ и ЭНГ, устанавливают различ-

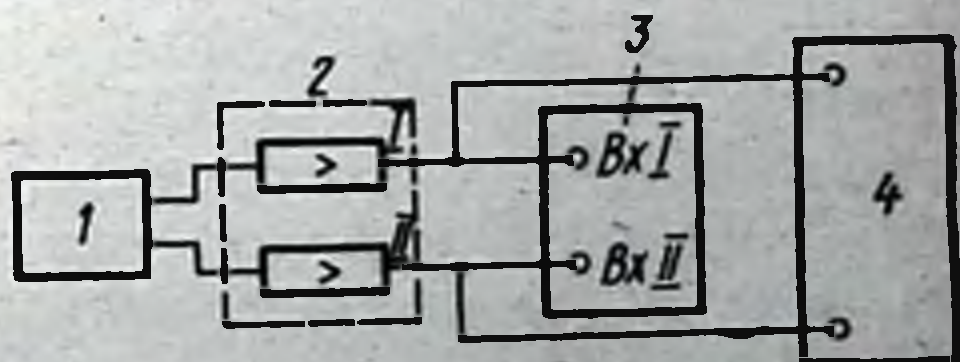


Рис. 140. Функциональная схема установки:

1 — объект, 2 — усилитель биопотенциалов, 3 — электронный осциллограф, 4 — шлейфовый осциллограф; Вх — входы осциллографа

ные ограничения со стороны высоких и низких частот. Ставят на калибраторе 50 мкВ, тумблер на индикаторе «I—II» в положении I и, меняя величину усиления, добиваются того, чтобы величина калибровочного сигнала была равна одному-двум делениям на трубке индикатора и трем-четырем делениям на осциллографе. Установив усиление для I канала, переключают тумблер «I—II» в положение II, а величину калибровочного сигнала в положение 5 мВ. Вращая ручку усиления II канала, добиваются того, чтобы величина калибровочного сигнала была равна одному делению на трубке индикатора и одному делению на осциллографе. На осциллографе Н-107, являющимся 12-канальным прибором, используют только три канала — для записи ЭКГ, ЭНГ и отметки раздражения. В гнездах осциллографа установлены гальванометры М004, подобранные по чувствительности и полосе пропускания частот. Для записи ЭНГ применяют гальванометр М004-2,5 с полосой пропускания от 0 до 1200 Гц. Для записи ЭКГ применяют гальванометр М004-1,2 с полосой пропускания 0—600 Гц. Такого же типа гальванометр используют для регистрации отметки раздражения. Найдя «зайчики» гальванометров на экране осциллографа, располагают их таким образом, чтобы калибровочный сигнал ЭНГ находился в верхней половине экрана, калибровочный сигнал ЭКГ — в нижней половине ближе к середине, а «зайчик» для отметки раздражения — на самой нижней границе экрана. Отметку раздражения включают тумблером, который замыкает цепь, состоящую из последовательно соединенных батарейки и сопротивления. Запись производят на пленке при скорости движения 50 мм/с. Отметка времени записывается на пленке при включении на осциллографе соответствующего тумблера. Для визуального контроля за ЭНГ и ЭКГ используют индикатор УБП и электронный осциллограф.

Задача 1. Изучение афферентной активности в сердечных нервах лягушки

Ход работы. 1. После окончания препаровки положить обездвиженную лягушку вентральной стороной вверх на корковую пластинку и поместить в экранированную камеру.

2. Наложить электроды для отведения ЭКГ и ЭНГ. Для регистрации ЭКГ применять игольчатые электроды, которые вкалываются в передние лапы животного. Для регистрации ЭНГ на серебряные или платиновые проволочные электроды (диаметр проволоки 0,2—0,3 мм, межэлектродное расстояние около 3 мм) наложить периферический конец сердечной веточки правого вагосимпатического ствола.

3. Животное обязательно заземлить.

4. Перевести ручку «работа-калибровка» на обоих каналах УБП в рабочее положение и еще раз проверить правильность подобранного усиления. Если при включении в положении «работа» на экране осциллографа произошло смещение лучей, вернуть

лучи в исходное положение с помощью ручки «установка нуля» на соответствующем блоке усилителя. В течение работы неоднократно проверять уровень нулевой линии усилителя.

5. Зарегистрировать исходную афферентную активность в периферическом конце сердечной веточки. *Следить за тем, чтобы конец лигатуры не касался тела лягушки (с целью уменьшения артефакта ЭКГ) и чтобы нерв не пересыхал!* Для этого после каждой записи нерв смачивать раствором Рингера и подсушивать фильтровальной бумагой.

6. Сделать ряд гемодинамических проб, изменяющих наполнение предсердий или желудочка сердца: а) пережать дугу аорты; б) пережать одну из полых вен; в) наложить мягкую лигатуру на атриовентрикулярную границу. Во время каждой из проб записать исходную афферентную импульсацию, изменение ее на фоне пробы и восстановление исходной активности после прекращения пробы.

Задача 2. Изменение афферентной активности при разных степенях растяжения сердца

Ход работы. 1. Зарегистрировать изменение афферентной активности при введении в полость правого предсердия разных объемов жидкости или крови от 0,02 до 0,4 мл. При регистрации исходной афферентной активности, *не выключая записи*, ввести соответствующий объем крови с одновременным замыканием тумблера отметки раздражения и продолжить регистрацию в течение 10—20 с. Если в течение этого времени восстановления исходной активности не произошло, записать восстановление активности через 1—1,5 мин.

2. После прекращения записи объем крови, равный введенному, вывести.

Обработка результатов. Выделить зарегистрированные типы активности. Разобрать их приуроченность к фазам сердечного цикла. Проследить за изменением афферентной импульсации и деятельности сердца при различных изменениях гемодинамики. Сопоставить изменения в деятельности сердца и вариации активности в сердечных нервах. Для просчета частоты импульсации использовать аппарат для чтения микрофильмов «Микрофот», объектив «Юпитер-8» с $F=50$ и коллектор для объектива $F=35$.

ПОДТЕМА 2. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПРИУРОЧЕННОСТИ АФФЕРЕНТНЫХ ЗАЛПОВ К ФАЗАМ СЕРДЕЧНОГО ЦИКЛА ДЛЯ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОЙ РЕФЛЕКТОРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЦА

В этой подтеме предстоит изучить роль приуроченности афферентных залпов к определенным фазам сердечного цикла, имитированных электрическим раздражением нервов, в вызове рефлекторной брадикардии.

Методика. Основные приборы и оборудование. Стимулятор типа ЭСУ-1 или ЭСУ-2; усилитель типа УБП1-02; формирующее

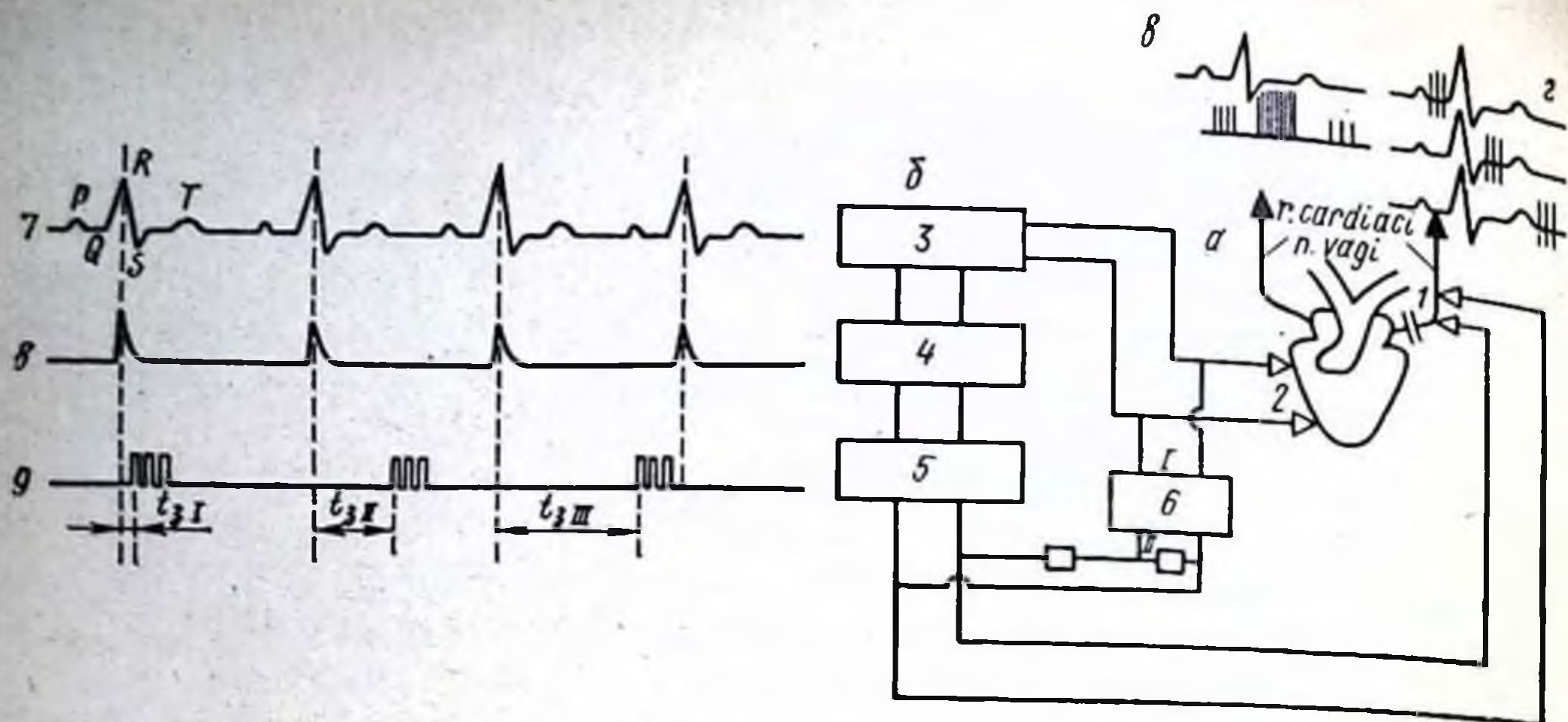


Рис. 141. Схема эксперимента (по В. Н. Каменской и др., 1976):

α — препарат сердца лягушки с сердечными веточками вагосимпатических стволов и положение раздражающих (1) и отводящих ЭГ сердца (2) электродов, δ — функциональная схема установки с обозначением процессов, полученных на выходе соответствующих приборов, θ — афферентные залпы от механорецепторов сердца, ε — положение раздражающих пачек относительно фаз сердечного цикла; 3 — усилитель ЭКГ, 4 — формирователь ЭКГ, 5 — ЭСУ-1, 6 — электрокардиограф, 7 — ЭГ сердца, 8 — результат формирования зубца R, 9 — пачки стимулов, раздражающих левый сердечный нерв; t_3 — время задержки

устройство, предназначенное для формирования переднего фронта зубца R ЭКГ; электрокардиограф; биполярные проволочные электроды для раздражения нерва; электроды для регистрации ЭГ или ЭКГ; корковая пластинка; набор хирургических инструментов; цепь для отметки раздражения.

Функциональная схема установки представлена на рис. 141. ЭКГ с выхода усилителя поступает на специальный формирователь. Длительность переднего фронта зубца R после формирования не превышает 3—5 мкс. Этим импульсом запускается стимулятор, работающий в режиме одиночных серий. Установка частоты и длительности импульсов в серии и времени задержки начала серии относительно запускающего импульса (в данном случае преобразованного зубца R ЭКГ) производится с соблюдением условий, изложенных в разделе I.

При отсутствии стимулятора, позволяющего получать одиночные серии, возможно использование двух простых стимуляторов (например, ЭСЛ-1 и ЭСЛ-2). В этом случае работу осуществляют следующим образом (рис. 142). Сформированным зубцом R запускается стимулятор ЭСЛ-2, импульсом с его выхода производится запуск стоящего в ждущем режиме стимулятора ЭСЛ-1. Длительность серии определяется

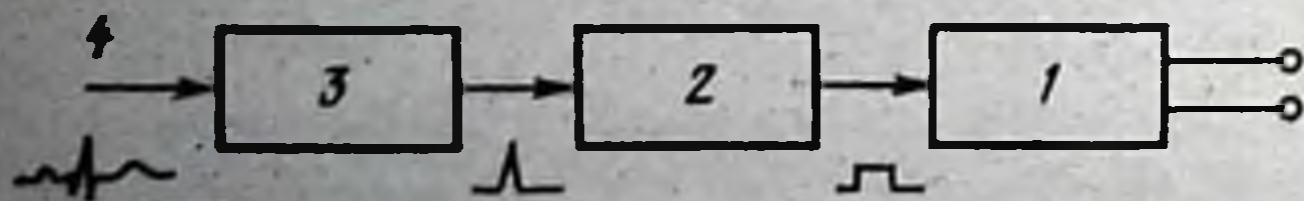


Рис. 142. Функциональная схема установки:
1 — ЭСЛ-1, 2 — ЭСЛ-2, 3 — формирователь, 4 — сигнал с выхода усилителя

длительностью импульса, идущего с ЭСЛ-2. Количество импульсов в серии зависит от частоты, установленной на

ЭСЛ-1, и длительности серии, т. е. длительности импульса на ЭСЛ-2.

Например, частота на ЭСЛ-1 установлена 20 Гц. Длительность серии 0,5 с, количество импульсов в серии равно 10. Время задержки устанавливается на ЭСЛ-2. Амплитуда выходных импульсов и их длительность в серии устанавливается на ЭСЛ-1. При использовании описанного метода производится несложная переделка стимулятора ЭСЛ-1.

Препаровка. 1. Укрепляют необездвиженную лягушку на корковой пластинке (см. тему VII).

2. Исключают участие симпатической нервной системы в осуществлении сердечного рефлекса удалением 2-го и 3-го симпатических ганглиев (способ десимпатизации см. в теме VII).

3. Обнажают сердце так же, как это описано в 1-й подтеме.

4. Отпрепаровывают левую сердечную веточку вагосимпатического ствола (ход препаровки см. в 1-й подтеме работы) и накладывают лигатуру ближе к сердцу.

5. Перерезают нерв ближе к сердцу и укладывают центральный конец на раздражающие биполярные проволочные электроды (нихромовые или серебряные, диаметр проволоки 0,2—0,3 мм, межэлектродное расстояние 2—3 мм).

6. Для вызова рефлекторных изменений в ритме сердцебиений раздражают центральный конец нерва пачками электрических стимулов от стимулятора ЭСУ-1. Стимулятор запускается специально сформированным зубцом *R* ЭКГ. Приуроченность стимулирующих залпов к определенным фазам сердечного цикла определяется временем задержки по отношению к зубцу *R*. Время задержки устанавливают на стимуляторе. Число импульсов в пачке 2—9; длительность стимула 0,5—1 мс, частота импульсов в пачке 20—40 имп/с. Пачки подают с частотой 1 пачка на 1 сердечный цикл в течение 2—5 последовательных сердечных сокращений с определенной задержкой по отношению к зубцу *R* ЭКГ. Задержку для каждой данной длительности сердечного цикла устанавливают таким образом, чтобы раздражающие пачки попадали в следующие фазы сердечного цикла: интервал *S* — *T* (время задержки t_{3I} 200—400 мс), интервал *T* — *P* (время задержки t_{3II} 700—800 мс), интервал *P* — *R* (время задержки t_{3III} 1000—1200 мс). Выбор этих интервалов определялся тем, что типичные разряды механорецепторов сердца лягушки приурочены именно к этим фазам сердечного цикла (см. рис. 138).

7. Отлаживают регистрацию деятельности сердца в виде записи ЭГ или ЭКГ на электрокардиографе. В случае регистрации ЭГ сердца применяют фитильковые электроды, при регистрации ЭКГ — игольчатые. На 2-й канал электрокардиографа подают отметку раздражения. Скорость движения ленты 10—25 мм/с.

Ход работы. 1. Определить общую длительность сердечного цикла в миллисекундах.

2. В соответствии с определенной вами длительностью сердечного цикла выяснить точное время задержки, соответствующее t_1 ,

t_{II} и t_{III} , для попадания пачек стимулов в интервалы $S-T$, $T-P$ и $P-R$ ЭКГ. При частоте сердцебиений 43 удара/мин длительность сердечного цикла составляет примерно 1300 мс. Время задержек, приведенное в методике, дано для этой частоты сердцебиений.

3. Зарегистрировать хронотропные изменения деятельности сердца при различных задержках афферентной стимуляции, что имитирует афферентную сигнализацию от сердца, возникающую во время интервалов $S-T$, $T-P$ и $P-R$ (амплитуда импульсов, число и частота импульсов в пачке остаются постоянными).

4. После выяснения задержки, вызывающей максимальное изменение ритма сердцебиений, изучить градации хронотропного эффекта на сердце в зависимости от числа импульсов в пачке (амплитуда импульсов и длительность импульса остаются постоянными).

5. Изучить градацию хронотропного эффекта на сердце в зависимости от частоты импульсов в пачке (при варьировании частоты необходимо учитывать соотношение между частотой и длительностью стимула). Амплитуда импульсов и число импульсов в пачке остаются постоянными.

6. Изучить градацию хронотропного эффекта на сердце в зависимости от напряжения раздражающих стимулов. Число и частота импульсов в пачке остаются постоянными.

7. В случае возникновения положительных хронотропных эффектов на сердце изучить нервную природу рефлекторного учащения сердцебиений. Для этого в сердце ввести β -адреноблокатор типа индерала (0,2 мг/100 г массы животного) и через 5—10 мин повторить указанные выше раздражения центрального конца сердечной веточки.

Обработка результатов. Выяснить зависимость величины хронотропного эффекта и латентного периода ответа от времени приложения пачки стимулов по отношению к фазам сердечного цикла. Представить графические зависимости этих соотношений. Показать зависимость эффекта от числа импульсов в пачке. Дать зависимость эффекта от частоты импульсов в пачке. Продемонстрировать зависимость эффекта от напряжения раздражающих стимулов. Исследовать нервный механизм рефлекторного учащения сердцебиений.

Рекомендуемая литература: [13]; [27]; [31]; [48] — с. 425—438.

ТЕМА IX. ВИСЦЕРО-КАРДИАЛЬНЫЕ РЕФЛЕКСЫ НА СЕРДЦЕ С МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Висцеро-кардиальные рефлексy обнаружены у всех классов позвоночных животных. Они возникают при патологических изменениях в желудке, желчных путях, печени, легких, кишечнике, в органах выделения и могут быть вызваны раздражением этих органов. При разнообразных воздействиях на внутренние органы наблюдают глубокие регуляторно-трофические изменения деятельности сердца и, прежде всего, появление глубокого рефлекторного торможения или учащения работы сердца. Часто при этих условиях наблюдаются разного рода

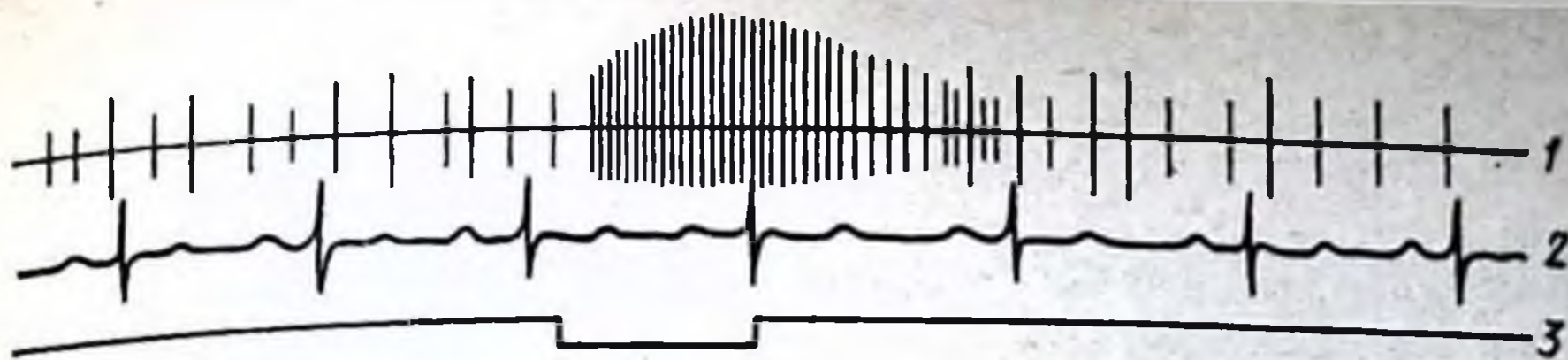


Рис. 143. Изменение импульсации X пары спинно-мозговых нервов и ЭКГ при растяжении мочевого пузыря лягушки:

1 — электронейрограмма спинно-мозгового нерва, 2 — ЭКГ, 3 — отметка раздражения

аритмии сердца, изменение интервала $P-R$, атриовентрикулярный блок, экстрасистолия.

Висцеро-кардиальные рефлексы в основном не являются нормально функционирующими рефлексами; они — патологические, возникающие при значительных изменениях функционирования одного из внутренних органов. Эти рефлексы часто обнаруживаются в клинических условиях, проявляясь в виде значительных нарушений деятельности сердца, поэтому исследование их путей и характера проявлений необходимо.

Изучение этих рефлексов при искусственном раздражении желудка, кишечника, желчного и мочевого пузыря показало, что характер ответов на сердце определяется величиной афферентной импульсации от раздражаемого органа и величиной эфферентной импульсации в сердечных ветвях блуждающих нервов. Нижним уровнем замыкания этих рефлексов являются вагусные ядра продолговатого мозга. Один из примеров изменения деятельности сердца и афферентной импульсации, идущей от мочевого пузыря при его искусственном раздражении, представлен на рис. 143.

Цель работы. Изучить рефлекторные изменения деятельности сердца при экспериментальных воздействиях на мочевой пузырь лягушки. Исследовать афферентную активность от мочевого пузыря при разных степенях раздражающего воздействия и выяснить пути этого рефлекса.

Методика. Основные приборы и оборудование. Усилитель типа УБП2-03; осциллограф типа Н-107; осциллограф типа С1-16; регистрирующие биполярные проволочные серебряные электроды; электроды для регистрации ЭКГ; катетер для введения в мочевой пузырь; шприц на 5 мл; цепь для отметки раздражения; корковая пластинка; набор хирургических инструментов, экранирующая камера. Функциональная схема установки показана на рис. 140.

Препаровка. 1. Лягушку с интактной нервной системой (необездвиженную) укрепляют вентральной стороной вверх на корковой пластинке с помощью марлевых петель на конечностях.

2. Разрезают кожу, вскрывают грудобрюшную полость, по средней линии пересекают плечевой пояс и освобождают сердце от перикарда.

3. С помощью серфина приподнимают сердце за верхушку желудочка и с двух сторон отпрепаровывают сердечные веточки вагосимпатических стволов так, как это описано в теме VII (см. рис. 136).

4. Делают продольный разрез брюшных мышц немного латеральнее средней линии живота, где проходит брюшная вена. Брюшную вену перерезают, предварительно наложив на нее две лигатуры.

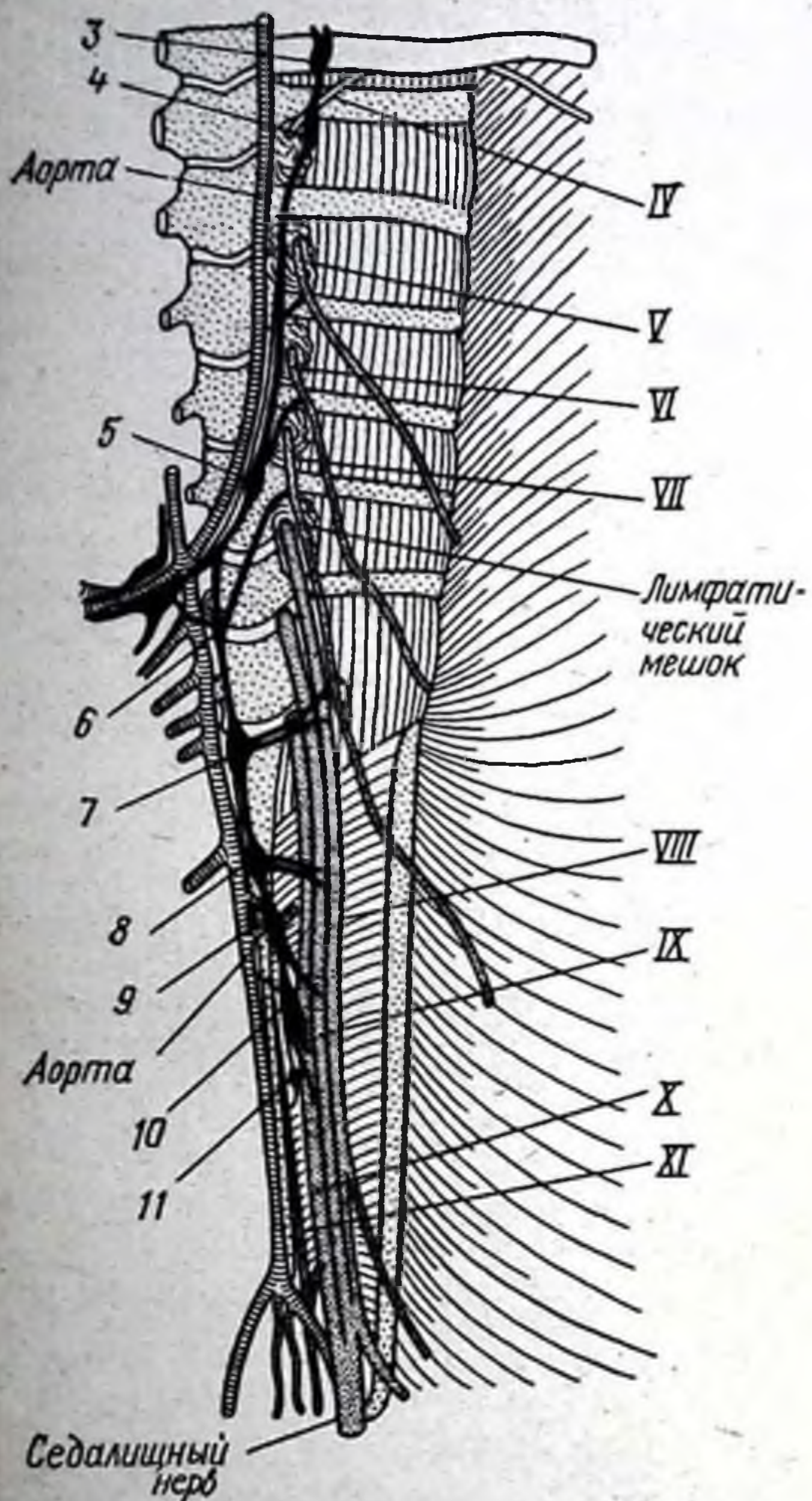


Рис. 144. Локализация спинно-мозговых нервов у лягушки:

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 — симпатические ганглии, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI — спинно-мозговые нервы (из J. Тахi, 1976, с изменениями)

5. Отпрепаровывают VII—VIII и X—XI пары спинно-мозговых нервов, идущие вдоль позвоночного столба (рис. 144), и один из нервов, лучше самый тонкий, берут на лигатуру.

6. В верхушку одной из lobов мочевого пузыря вводят канюлю, предварительно соединенную со шприцем и заполненную раствором Рингера или физиологическим раствором. При вставлении канюли не доотрагиваться до мочевого пузыря хирургическими пинцетами! Используют только анатомические пинцеты, желательно с тупыми концами. На канюлю накладывают тугую лигатуру и канюлю прочно укрепляют на корковой пластинке. При укреплении канюли обращают внимание на то, чтобы кончик канюли не упирался в стенку мочевого пузыря. Раздражают мочевой пузырь введением в него разных объемов раствора с последующим выведением равного объема; количества вводимого объема варьиру-

ют от 0,2 до 3 мл. Выведение раствора из мочевого пузыря хорошо осуществляется только при условии, если кончик канюли не касается стенки мочевого пузыря.

7. После окончания препаровки корковую пластинку с лягушкой помещают в экранирующую камеру.

8. Налаживают одновременную регистрацию деятельности сердца в виде записи ЭКГ или ЭГ и электрической активности одного из спинно-мозговых нервов (ЭНГ) так же, как и в 1-й подтеме темы VIII.

Задача 1. Регистрация афферентной активности спинно-мозгового нерва при разных степенях раздражающего воздействия на рецепторы мочевого пузыря

Ход работы. 1. Наложить электроды для отведения ЭКГ и ЭНГ. Для регистрации ЭКГ применять игольчатые электроды, которые вкалываются в передние лапы животного, а для записи ЭНГ — проволочные биполярные серебряные электроды с межэлектродным расстоянием 3—4 мм; диаметр проволоки 1—2 мм.

2. Животное заземлить.

3. Ручку «работа-калибровка» на УБП перевести в положение «работа» и еще раз проверить правильность подобранного усиления. Если при этом произошло смещение лучей на экране шлейфового осциллографа, вернуть луч в исходное положение с помощью ручки «установка нуля». В течение работы неоднократно проверять уровень нулевой линии усилителя.

4. В исходном состоянии записать ЭКГ и афферентную активность в одном из спинно-мозговых нервов. В норме в спинно-мозговых нервах регистрируется исходная нерегулярная импульсация небольшой амплитуды (около 20 мкВ); иногда спонтанная импульсация не обнаруживается.

5. Зарегистрировать при разных степенях растяжения мочевого пузыря (путем быстрого введения раствора) изменение деятельности сердца и вариации биоэлектрической активности. Изменение ритма сердца просчитать по интервалам *P-P* или *R-R* ЭКГ. В момент раздражения мочевого пузыря происходит значительное увеличение имеющейся активности или возникновение залпа импульсов в случае отсутствия активности в исходном состоянии. Введение жидкости в мочевой пузырь осуществлять на фоне записи ЭКГ и ЭНГ.

6. Зарегистрировать изменение деятельности сердца и афферентной активности спинно-мозгового нерва при быстром и медленном введении одного и того же количества раствора. После каждого введения жидкости выводить ее из мочевого пузыря.

Задача 2. Выяснение рефлекторных путей при осуществлении висцеро-кардиального рефлекса с мочевого пузыря

Ход работы. 1. После записи стандартных изменений ритма сердцебиений и афферентной сигнализации от мочевого пузыря осуществить десимпатизацию сердца (см. тему VII) и повторить раздражения прежней силы.

2. Перерезать левую сердечную веточку и повторить раздражения прежней силы.

3. Перерезать правую сердечную веточку и повторить раздражения той же силы.

4. Перерезать спинно-мозговой нерв и на фоне записи активности от его периферического конца повторить растяжения моче-

вого пузыря. При регистрации ЭНГ внимательно следить за тем, чтобы лягушка не двигалась, так как мощные мышечные токи будут маскировать полностью нервную активность. Избегать соприкосновения электродов с тканями.

Обработка результатов. Описывают характер ответа сердца. Выявляют зависимость величины хронотропного эффекта от степени растяжения мочевого пузыря. Сопоставляют величины афферентной импульсации и ответа сердца. Обсуждают вопрос о причинах различий в эффектах на сердце при быстром и медленном введении одного и того же объема жидкости. Выявляют эфферентный путь рефлекса. Дают схему рефлекторной дуги. Для подсчета импульсов (частота и амплитуда) используют аппарат для чтения микрофильмов «Микрофот», объектив «Юпитер-8» с $F-50$ и коллектор для объектива $F-35$.

Рекомендуемая литература: [40] — с. 180—194; [44] — с. 155—175; 210—217; [48] — с. 495—500.

ТЕМА X. НЕРВНАЯ И ГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СЕРДЦА И СОСУДОВ

Общая гемодинамика организма определяется минутным выбросом крови, минутным объемом — МО и сопротивлением сосудистого русла. Одним из показателей общей гемодинамики является артериальное давление (АД). Запись АД представляет собой кривую, на которой, как правило, видны волны двух, а иногда даже трех порядков. Волны I порядка — *сердечные* волны — обусловлены изменением АД во время деятельности сердца: в момент систолы сердца давление максимальное. Волны II порядка — *дыхательные*; они связаны с изменением АД во время дыхательного цикла. При вдохе давление повышается. Регистрация ЭКГ выявляет, что во многих случаях частота сердцебиений также показывает дыхательную периодику; во время вдоха частота сердечных сокращений (ЧСС) увеличивается, во время выдоха — понижается. При вдохе давление в грудной полости уменьшается, а в брюшной полости увеличивается, что способствует оттоку крови из многочисленных сосудов брюшной полости в полые вены и, соответственно, в сердце. При увеличении притока крови к правому сердцу давление в устьях полых вен и в правом предсердии возрастает, что обуславливает учащение сердцебиений за счет рефлекса Бейнбриджа (см. тему VII). При выдохе давление внутри грудной полости увеличивается, препятствуя усиленному растяжению сердца во время диастолы и возникновению рефлекса Бейнбриджа. Какими факторами обусловлены волны III порядка, сказать трудно. Предполагают, что они связаны с периодическими колебаниями активности вегетативной нервной системы.

Минутный объем сердца, т. е. количество крови, выбрасываемой сердцем в течение 1 мин, обуславливается как ЧСС, так и систолическим объемом (СО), т. е. *систолическим выбросом*. В условиях относительного покоя у человека и животных основной переменной, увеличивающей МО, является частота сердцебиений. При слабой физической нагрузке увеличение МО почти полностью зависит от ЧСС, только при значительном возрастании физической нагрузки МО в большой мере становится обусловленным систолическим выбросом сердца. Роль СО в определении гемодинамической производительности сердца преобладает у животных и после денервации сердца. Однако перенос механизмов регуляции МО, установленных на денервированных сердцах, на механизм регуляции МО у нормально функционирующего сердца без каких-либо дополнительных контролей не является правомерным. Таким образом, в условиях нормального функционирования организма роль ЧСС в определении гемодинамической производительности сердца весьма значительна и поэтому исследование регуляции сердца на примере ее изучения имеет большое значение.

Регуляция сердца может определяться как местными механизмами, так и центральными. К местным механизмам относят многоклеточный механизм (механизм Старлинга) и нервный внутрисердечный. Центральная регуляция сердца также подразделяется на две: нервную и гуморальную. Полагают, что среди них главенствующая роль в оформлении запускающих влияний принадлежит нервной регуляции как наиболее мобильной. Вследствие большой латентности воздействий гуморальных влияний последние обладают способностью к модуляции эффектов чисто нейрогенного происхождения.

Центральная регуляция сердца и кровообращения в целом осуществляется с учетом как потребности всего организма в изменении гемодинамики, так и возможностей и потребностей самого сердца и сосудов. Последнее осуществляется благодаря наличию в сердечно-сосудистой системе рефлексогенных зон, основными из которых являются *рефлексогенная зона* самого сердца (с которой возникает уже описанный ранее кардио-кардинальный рефлекс, или рефлекс Бейнбриджа), *синокаротидная* и *аортальная* зоны и *зона легочных сосудов*. В зависимости от давления в рефлексогенных зонах, обусловливаемого в первую очередь величиной кровотока, возбуждение механорецепторов этих зон приводит к возникновению рефлекторных изменений деятельности сердца, которые могут быть направлены как на увеличение его гемодинамической производительности, так и на ее уменьшение.

Приспособление деятельности сердца и всего кровообращения к потребностям организма в изменении гемодинамики осуществляется высшими отделами головного мозга, которые на основании приходящей к ним афферентной сигнализации оказывают модулирующие влияния на сердечный и сосудистый «центры» продолговатого и спинного мозга, где происходит замыкание центральных сердечных или сосудистых рефлексов.

Адаптивная нервная регуляция сердца осуществляется при тесном взаимодействии парасимпатического и симпатического отделов вегетативной нервной системы. Долгое время считали антагонистичными и реципрокными влияния этих отделов на регуляцию сердца: парасимпатическая нервная система тормозит деятельность сердца, а симпатическая — усиливает. Это представление возникло из результатов экспериментов, выполненных в неадекватных условиях опытов: наркотизация животного, стимуляция целых нервных стволов и т. д. По мере совершенствования методов исследования, когда стал возможным эксперимент на ненаркотизированных нефиксированных животных и когда при исследовании роли того или иного отдела вегетативной нервной системы осуществляют стимуляцию не всего нервного ствола, а лишь отдельных его фрагментов, что приближается к активации нервных волокон в естественных условиях, появились многочисленные сведения о возможности разнонаправленной регуляции сердца со стороны только парасимпатической нервной системы. В настоящее время многие авторы считают, что парасимпатическая иннервация сердца в обычных условиях существования организма играет определенную роль.

Несмотря на очевидность факта, что наркотизация животного или стимуляция целых нервных стволов в значительной мере искажают или видоизменяют исходные и характерные эффекты на сердце, указанные методические приемы широко применяют вплоть до настоящего времени, что связано с некоторыми их преимуществами. Так, при исследовании механизмов регуляции сердца у ненаркотизированных животных всегда трудно быть уверенным в отсутствии болевых или поведенческих реакций, которые в значительной степени маскируют исходные эффекты. Оба типа реакций (болевые и поведенческие) отсутствуют у наркотизированных животных. В то же время изучаемые у таких животных механизмы регуляции сердца могут рассматриваться только как модельные и применимость результатов этих исследований к другим условиям эксперимента должна быть тщательно проанализирована.

Цель работы. Изучить характер реакции сердца и АД у наркотизированных кошек при воздействиях, моделирующих рефлексы, имеющие важное значение в повседневной жизни человека и животных. Одновременно с этим исследовать принципиальные различия в латентных периодах возникновения эффектов на сердце



Рис. 145. Локализация сонной артерии, симпатических и блуждающих нервов на шее кошки:

1 — рваное отверстие, 2, 3, 5 — наружная, внутренняя и общая сонные артерии соответственно, 4 — наружная яремная вена, 6 — блуждающий нерв, 7 — языкоглоточный нерв, 8 — верхний шейный симпатический ганглий, 9 — узловатый ганглий, 10 — синусный нерв, 11 — симпатический нерв, 12 — поперечная вена, 13 — трахея

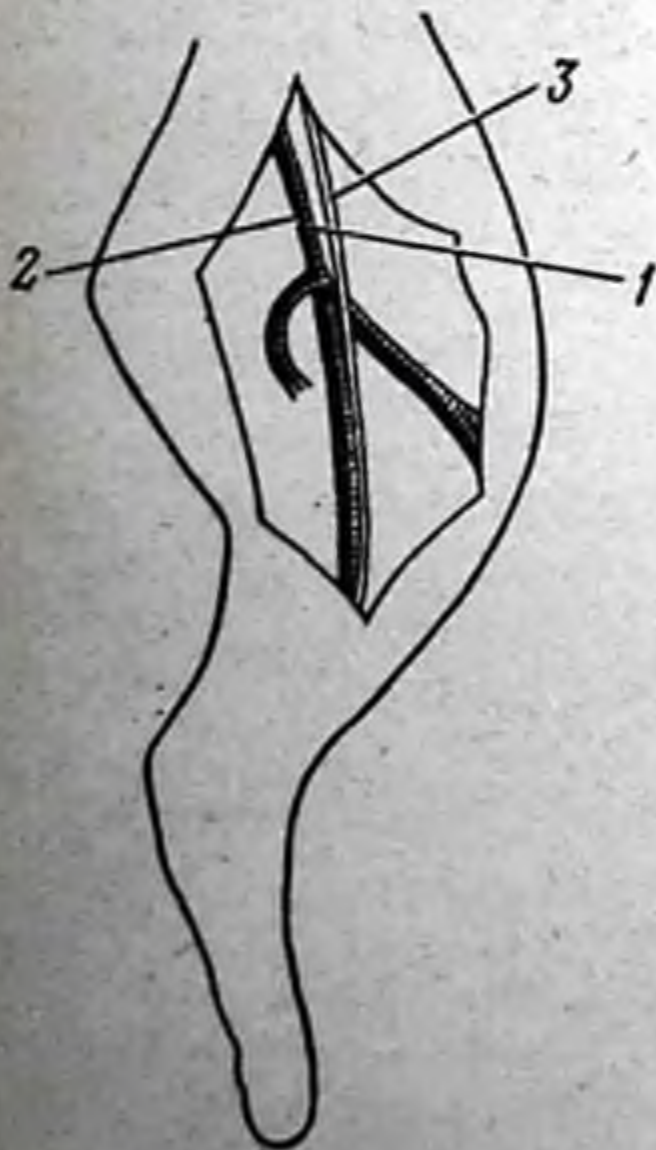


Рис. 146. Топография бедренных артерий (1) и вен (2) и седалищного нерва (3) в верхней части задней конечности кошки

и давлении, обусловленные нейрогенными или гуморальными стимулами.

Методика. Основные приборы и оборудование. Самописец НЗЗ8-6 или электрокардиограф типа ЭЛКАР-6; электроманометр; усилитель типа УБП1-02 или УБП2-03; угольный датчик в эластичном исполнении для регистрации дыхания; раздражающие биполярные электроды проволоочные; игольчатые электроды для отведения ЭКГ; катетер для введения в сердце; канюля или катетер для введения в артерию; 3 шприца на 1—2 мл; шприц на 10 мл; хирургический столик для кошки; набор хирургических инструментов: ножницы большие прямые и изогнутые, ножницы глазные — 1, пинцет средний анатомический — 1, пинцет средний хирургический — 1, пинцет глазной анатомический — 2, пинцет глазной хирургический — 2, зажимы Пеана — 3, зажимы Кохера — 3, зажимы Диффенбаха — 2, крючки стеклянные и металлические — 2, скальпель — 1, фидер — 2, ранорасширители — 2, термокаутер; 3-ходовой кран.

Препаровка. 1. Кошке внутрибрюшинно вводят растворы хлоралозы 50—60 мг/кг массы и 10 мг/кг нембутала.

2. Уснувшее животное кладут на операционный стол брюшной стороной вверх и выстригают шерсть на шее и на внутренней поверхности бедра.

3. Делают разрез термокаутером или скальпелем по средней линии шеи и отсепааровывают кожу с двух сторон. Непосредственно под кожей справа и слева проходят наружные яремные вены.

4. Отпрепаровывают вену с одной из сторон (лучше с правой), тщательно отделив ее от соединительной ткани, и подводят две лигатуры.

5. Отпрепаровывают сонные артерии и блуждающий нерв на шее. Для этого делают разрез по средней линии мышц, раздвигают их фидерами или крючками и закрепляют в таком положении ранорасширителями. Отыскивают сосудисто-нервные пучки, они расположены по обе стороны от трахеи, латеральнее и несколько глубже ее (рис. 145). Каждый пучок состоит из более

толстого, блуждающего нерва, более тонкого, симпатического нерва и крупного сосуда — общей сонной артерии. С обеих сторон выделяют сонные артерии на протяжении 3—4 см и подводят под них толстые лигатуры, не затягивая последние.

6. Накладывают две лигатуры на один из блуждающих нервов (лучше правый) на расстоянии 2—3 мм друг от друга. Лигатуры также не затягивают.

7. Для регистрации АД отпрепаровывают бедренную артерию, располагающуюся на внутренней поверхности бедра (рис. 146). Лучше всего она выявляется в верхней части бедра; положение ее легко определить по пульсации. В этом месте раздвигают мышцы, отпрепаровывают артерию на расстоянии 3—4 см и накладывают на нее две лигатуры, не затягивая их.

8. Приступают к введению катетера в сердце через наружную яремную вену (предварительно определяют объем катетера). Одной из наложенных ранее лигатур перевязывают вену как можно дальше от сердца; концы лигатуры не отрезают. Делают надрез вены ниже места перевязки (ближе к сердцу). Вставляют в вену по направлению к сердцу катетер, соединенный с 2-миллилитровым шприцем через 3-ходовой кран, которые предварительно заполнены раствором Рингера с гепарином (1 мл гепарина — 5000 МЕ на 100 мл раствора). При вставлении катетера удобно пользоваться стеклянным крючком: вначале вводят в вену крючок и по нему вставляют катетер. Наружный диаметр катетера 2—2,5 мм; внутренний — не менее 1 мм. Длина катетера должна быть на 3—5 см больше расстояния от сердца до перевязанной лигатуры на наружной яремной вене. Положение сердца определяют пальпацией; у кошки массой около 3 кг это расстояние равно примерно 13—15 см. Постепенно «проталкивают» катетер по направлению к сердцу, замечая, на какую длину (см) он введен в вену. Не доводя конец катетера на 1—2 см до сердца, вводят 0,5—1 мл раствора. Если расчеты были верные, то шприцем трудно вывести введенный раствор. Выведение без каких-либо трудностей происходит только в том случае, если конец катетера вошел в сердце в правое предсердие или он располагается в непосредственной близости от сердца. Если кровь не выводится, «проталкивают» катетер еще на 1—2 см и повторяют введение раствора с последующим выводением. В случае выведения крови, что означает расположение катетера в сердце, укрепляют катетер в вене, затянув свободную лигатуру. Оставшимися концами 1-й лигатуры еще раз фиксируют положение катетера. Соединив 3-ходовой кран с еще одним шприцем, заполненным гепарином, вводят в сердце 0,3—0,4 мл гепарина 1500 МЕ для предотвращения свертывания крови. Принимая во внимание объем катетера, равный примерно 0,1—0,4 мл, из 1-го шприца вводят физиологический раствор или кровь в объеме, равном объему катетера, чтобы быть уверенным, что весь гепарин попал в циркуляторную систему.

9. Вставляют канюлю в бедренную артерию. Для этого одной из лигатур перевязывают артерию как можно дальше от сердца,

а на центральный конец (ближний к сердцу) накладывают зажим Диффенбаха. Между лигатурой и зажимом (ближе к лигатуре) глазными ножницами делают надрез, в который вводят канюлю (или катетер), соединенную через кран, с системой манометра, предварительно заполненной физиологическим раствором. Кран должен быть закрыт. Канюля и катетер, непосредственно соединенный с канюлей, также заранее заполняют физиологическим раствором с гепарином. Снимают зажим Диффенбаха и после продвижения канюли на 5—10 мм в сосуд туго закрепляют ее лигатурой и фиксируют оставшимися концами 1-й лигатуры. Открывают кран, соединяющий канюлю с манометром.

10. Животное заземлить.

11. Налаживают запись АД на самописце. При условии регистрации АД электроманометром с индуктивным датчиком стержень индуктивного датчика подводят к мембране до соприкосновения с ней, о чем судят по отклонению стрелки на стрелочном индикаторном приборе. Стрелка должна быть в нулевом положении. Колебания АД, воспринимаемые мембраной и передаваемые стержню, меняют индуктивное сопротивление датчика. В результате с выхода электроманометра на самописце регистрируется процесс изменения АД.

12. Налаживают запись дыхания. Для этого на грудную клетку помещают угольный датчик, представляющий собой кусок нипельной трубки, заполненный гранулированным угольным порошком. Датчик преобразует механические колебания грудной клетки в электрические сигналы, которые и регистрируются на 2-м канале самописца.

13. На 3-м канале самописца налаживают запись ЭКГ (через УБП): игольчатые электроды лучше всего вколоть в одну из лап животного и область грудины.

14. На 4-м канале налаживают запись интервалограммы, амплитуда которой отражает длительность сердечного цикла. Производят калибровку интервалографа: к входу прибора подключают стимулятор ЭСЛ-2, устанавливают на нем длительность импульсов $t_n = 1$ мс, напряжение на выходе 2 В, частоту следования импульсов $F = 1$ Гц. Меняя на интервалографе уровень запуска, добиваются на самописце четкой записи пилообразного напряжения с периодом $T = 1/F = 1$ с. Меняя на стимуляторе период (частоту) в пределах необходимого диапазона интервалов зубцов R ЭКГ, записывают на самописце зависимость $U = F(t_n)$. Затем ко входу интервалографа подключают выход УБП, через который регистрируется ЭКГ, и производят запись интервалограммы. Меняя уровень запуска на интервалографе, добиваются на самописце записи, синхронной с частотой следования зубцов R ЭКГ. О длительности сердечного цикла судят по амплитуде, увеличение которой свидетельствует об урежении сердцебиений, а уменьшение — об учащении.

15. Налаживают отметку раздражения и включают метку времени. Скорость движения бумаги 2—10 мм/с.

Задача 1. Регистрация ЭКГ, АД и дыхания при имитации увеличения венозного притока к сердцу введением в полость правого предсердия разных объемов крови

Ход работы. 1. Зарегистрировать исходный уровень АД, ЧСС и дыхания в течение 1 мин.

2. На фоне записи 1-м шприцем, соединенным с катетером, который вставлен в сердце, ввести 0,5 мл физиологического раствора или крови комнатной температуры и температуры тела животного ($36-38^{\circ}\text{C}$). В физиологический раствор или кровь добавить гепарин из расчета 0,5 мл — 2500 МЕ на 100 мл раствора. Через 1—2 мин закончить запись.

После прекращения записи вывести объем крови, равный введенному.

4. Осуществить введение больших объемов крови или раствора — 1, 3, 5 и 7 мл с последующим выведением равного количества крови. Вводить кровь примерно с одинаковой скоростью.

5. Исследовать влияние разных скоростей введения одного и того же количества крови. Отметку раздражения давать с помощью кнопки, надетой на поршень шприца, или замыканием ключа, введенного в цепь батарейки.

Задача 2. Регистрация изменений ЧСС, АД и дыхания при пережатии сонных артерий

Ход работы. 1. Зарегистрировать исходный уровень ЧСС, АД и дыхания.

2. На фоне записи пережать с помощью ранее наложенных лигатур левую или правую сонную артерию на 3—10 с и продолжать запись до восстановления исходного уровня ЧСС, АД и дыхания.

3. На фоне записи пережать обе сонные артерии одновременно на 3—10 с и продолжать запись после снятия пережатия до восстановления исходного уровня ЧСС, АД и дыхания.

Задача 3. Регистрация ЧСС, АД и дыхания при раздражении центрального конца блуждающего нерва на шее

Ход работы. 1. На правом блуждающем нерве туго затянуть наложенные ранее лигатуры и перерезать его между ними.

2. Центральный конец нерва положить на биполярные стимулирующие проволочные электроды.

3. Изучить реакцию сердца, АД и дыхания при разных параметрах стимуляции: 1—100 имп/с; 1—5 В; 0,08—1 мс; длительность раздражения 2—10 с.

Задача 4. Регистрация ЧСС, АД и дыхания при стимуляции периферического конца блуждающего нерва

Ход работы. 1. Наложить на электроды периферический конец нерва.

2. Зарегистрировать изменения ЧСС, АД и дыхания при разных параметрах стимуляции: 1—100 имп/с; 0,1—2 В; 0,08—1 мс; длительность раздражения 2—10 с.

Задача 5. Регистрация ЧСС, АД и дыхания при введении раствора ацетилхолина

Ход работы. 1. Записать исходные уровни ЧСС, АД и дыхания.

2. На фоне записи через 2-й шприц, соединенный с 3-ходовым краном, ввести в сердце 0,5 мл раствора ацетилхолина (10^{-6} г/мл), а затем из 1-го шприца 0,5 мл физиологического раствора или крови, чтобы весь объем ацетилхолина оказался в циркуляторной системе. Регистрацию осуществлять до восстановления исходных уровней ЧСС, АД и дыхания.

Задача 6. Влияние альфа-адреноблокады на эффекты, вызванные имитацией увеличения венозного притока

Ход работы. Через 15—20 мин после введения в сердце через венозный катетер 2,5 мг/кг альфа-адреноблокатора феноксифенамина или фентоламина или 5 мг/кг тропafenа (объем 5—10 мл) повторить задачу 1.

Задача 7. Влияние альфа- и бета-адреноблокады на эффекты, вызванные имитацией увеличения венозного притока

Ход работы. Через 15—20 мин после введения в сердце через венозный катетер 1,5—2,0 мг/кг бета-адреноблокатора обзидана (объем 3—7 мл) на фоне альфа-адреноблокады повторить задачу 1.

Задача 8. Влияние М-холиноблокады на эффекты на сердце, вызванные имитацией увеличения венозного притока

Ход работы. Через 15—20 мин после введения 1 мг/кг М-холиноблокатора (сульфат атропина, метил-атропин или метацин) повторить задачу 1.

Задача 9. Регистрация изменений ЧСС, АД и дыхания при имитации увеличения венозного притока на ваготомированном сердце

Ход работы. 1. Перерезать второй блуждающий нерв на шее и через 15 мин повторить задачу 1.

2. Откалибровать электроманометр по ртутному манометру.

Обработка результатов. Описывают общий вид записи ЭКГ и АД. Рассчитывают исходные влияния ЧСС, систолического и диастолического давлений, частоту дыхания. Объясняют причины колебаний АД, регистрируемого в исходном состоянии. Объясняют механизм эффектов, возникающих при пережатии сонных артерий. Обсуждают причины различий реакций при одно- и двустороннем пережатии сонных артерий. Описывают возможные механизмы и характер эффектов, возникающих при имитации увеличения венозного притока. Выясняют первичность или вторичность сердечных и сосудистых реакций. Выявляют оптимальные параметры стимуляции для раздражения центрального и периферического концов блуждающих нервов, обсуждают причины различий ответов. Описывают эффекты, возникающие при введении растворов ацетилхолина. Обсуждают их механизмы. Выявляют сходство и различия в эффектах на сердце и АД, возникающих при нейрогенной и гуморальной стимуляции.

Рекомендуемая литература: [26] — с. 130—155, 181—189; [48] — с. 475—499, 503—505; [50] — с. 248—291.

ТЕМА XI. ЦЕНТРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СЕРДЦА И СОСУДОВ¹

Для рассмотрения вопросов, связанных с регуляцией деятельности сердца, необходимо иметь представление о ее роли в общей регуляции системы кровообращения. Локальные вариации кровообращения в соответствии со специфической деятельностью органа или ткани обеспечиваются метаболическим механизмом регуляции. Однако метаболический механизм, в значительной степени вызванный и обусловленный деятельностью данного органа, должен быть связан и скоррелирован с изменениями во всей системе кровообращения. Это возможно лишь за счет воздействия на метаболический механизм нейрогенных влияний. Последние также обуславливают изменения в деятельности сердца, необходимые для адаптации кровообращения в целом в соответствии с потребностями всего организма в изменении гемодинамики. Это обеспечивается центральными нервными механизмами.

Нервная регуляция вегетативных функций имеет ряд особенностей. Важнейшей из них является наличие у ряда эффекторных органов, таких, как сердце и кишечник, спонтанной активности, в результате чего центральные нервные команды не носят пускового характера, как в случае регуляции скелетной мускулатуры. Назначение нервной регуляции в данном случае заключается в модуляции спонтанной активности органа, повышении или понижении его активности. Другая характерная черта вегетативной регуляции заключается в наличии двойственной регуляции: симпатической и парасимпатической.

Наличие автоматической активности внутренних органов обуславливает серьезную методологическую трудность проведения экспериментального изучения

¹ В постановке и описании задач по данной теме принимал участие С. Ф. Дугин.

вегетативной регуляции: необходимо, чтобы во время эксперимента работа органа осуществлялась на уровне, близком к его автоматической активности. Только в этом случае возможно выявить истинные натуральные механизмы положительных и отрицательных регуляторных изменений.

В условиях острых опытов фиксация животного и хирургическое вмешательство вызывают болевой стресс, приводящий через активацию симпатической нервной системы к серьезным изменениям в работе внутренних органов. Наркотические вещества, вводимые для снятия боли, в свою очередь, сильно изменяют центральные механизмы регуляции и сопровождаются значительными вариациями спонтанной активности органов, в частности сердца. Изучаемые в таких условиях экспериментов механизмы тех или иных изменений деятельности органов могут привести к неправомерным выводам относительно механизмов регуляции в натуральных условиях функционирования организма.

В связи с этим для решения вопросов, связанных с механизмами нервной регуляции сердца, необходимо сочетание острой и хронической форм эксперимента. Это сочетание, а также развитие техники хронического эксперимента в кардиологии в течение последних двадцати лет позволило существенно пересмотреть некоторые классические представления о регуляции деятельности сердца.

В настоящее время можно выделить три группы методов, применяемых для изучения центральной нервной регуляции сердца.

Методы выключения нервных влияний на сердце. Они подразделяются на физические, хирургические и фармакологические. *Физические* методы характеризуются нарушением проведения потенциалов действия в нервных путях, посредством изменения окружающей среды, например холодовой блок. *Хирургические методы* — это перерезки, удаление или разрушение нервных структур, например, перерезка блуждающих нервов — ваготомия. Наиболее распространенные в настоящее время *фармакологические* методы основаны на применении веществ, блокирующих ганглионарную передачу (пентамин, гексаметоний, арфонад), передачу с постганглионарного аксона на эффекторные клетки (кураре, диплацин), а также на применении веществ, истощающих запасы медиатора в терминалях (резерпин) или разрушающих эти терминали (гуанетидин).

Хирургическая десимпатизация сердца собак позволила Кеннону и сотр. (1936) установить, что блуждающий нерв может регулировать частоту сердцебиений в отсутствие симпатической иннервации сердца. Это подтверждено экспериментами с применением фармакологических средств выключения симпатических влияний на сердце. Так, введение бета-адреноблокатора — индерала, устраняющего симпатические влияния на сердце, практически не изменяло величину первоначального рефлекторного учащения сердцебиений при слабых и средних физических упражнениях.

Труднее осуществляются селективные методы выключения парасимпатических влияний на сердце, поскольку, осуществляя блокаду импульсации по блуждающим нервам, экспериментатор выключает не только эфферентные влияния, но и лишает ЦНС важнейшего афферентного входа. Основную массу аксонов в блуждающих нервах составляют афферентные волокна: их в пять раз больше, чем эфферентных. Возникающая при перерезке блуждающих нервов деафферентация рефлекторно вызывает активацию симпатической системы, что приводит к увеличению частоты сердцебиений, затрудняя интерпретацию результатов, полученных при применении этого метода. Это обстоятельство не позволяет принять классическое объяснение постваготомической тахикардии снятием тормозного тонуса блуждающих нервов.

Для фармакологического выключения парасимпатических влияний на сердце используют атропин сульфат. Он легко проникает через гемэнцефалический барьер, вызывая центральную активацию симпатической нервной системы.

Таким образом, применявшиеся до настоящего времени методы выключения вагусных влияний на сердце не могут считаться достаточно селективными, так как их побочное действие довольно значительно. Однако использование методов хирургического и фармакологического выключения симпатических влияний на сердце позволило установить двойственный характер парасимпатической регуляции сердца.

Методы регистрации биоэлектрической активности нервных образований. Сюда относятся один из важнейших методов: метод регистрации биоэлектрической активности эфферентных путей. Однако его практическое применение сталкивается с рядом принципиальных и методических трудностей. Так, регистрация суммарной активности не позволяет судить об активности в отдельных элементах; регистрация активности одиночного нейрона не дает возможности получить представление о суммарной картине эфферентной активности; нет критериев для определения, какой орган или какие структуры органа иннервируются данным нейроном.

Для регистрации активности от нервных стволов приходится применять серьезные хирургические вмешательства, необходимые для препаровки нервов и выделения «чистой» эфферентной импульсации. Такие хирургические вмешательства, как ваготомия и вскрытие грудной клетки, сильно изменяют функционирование центров, участвующих в регуляции сердца.

Методы электрического раздражения нервных образований. Метод электрического раздражения эфферентных путей, т. е. моделирование натуральной активности, — это другой подход к изучению механизмов центральной регуляции деятельности сердца. При электрической стимуляции блуждающих нервов практически неизменно возникает торможение деятельности сердца. Однако при этом исследователи упускают из виду существенное обстоятельство: даже при пороговой стимуляции нервных путей активируется значительное число волокон, если не все волокна этого пути. В отличие от этого в натуральных условиях активации практически при любых формах воздействий, за исключением критической стрессовой ситуации, возбуждается незначительное количество волокон.

Именно с этим противоречием связано представление классической физиологии о чисто тормозном назначении парасимпатической нервной системы в отношении регуляции сердца. Оно возникло на основании результатов экспериментов, в которых осуществлялось раздражение всего нервного ствола блуждающего нерва. О роли количества одновременно возбуждающихся преганглионарных парасимпатических элементов в отношении формирования тормозного или ускорительного эффекта на сердце см. тему IV.

Для ограничения количества одновременно возбуждающихся нервных волокон используют метод дегенерации и наложения некротизированной ткани. В этих условиях перерождение волокон или выключение их из активности происходит не одновременно, а постепенно, благодаря чему возможно раздражение относительно большего или меньшего числа волокон при стимуляции в разные сроки после перерезки нерва. Уменьшение частоты раздражения в некоторой степени эквивалентно уменьшению числа активных волокон, так как в обоих случаях до сердца доходит относительно меньшая величина импульсации.

Дальнейшее развитие метода электрического раздражения направлено на использование его в условиях хронических экспериментов. В связи с этим большое значение приобретает метод *локальной электрической стимуляции ядерных структур мозга*, позволяющий активировать относительно небольшое число нейронов. При использовании этого метода следует иметь в виду возможность получения побочных реакций. В исследованиях, направленных на выяснение механизмов регуляции сердца, эти побочные реакции могут вызвать вторичные изменения в деятельности сердца. В связи с этим при вживлении микроэлектрода необходимо тщательно осуществлять поиск «точки», при стимуляции которой хронотропный эффект на сердце не сопровождается соматическими реакциями.

В последние годы метод локальной стимуляции приобрел большое значение в исследованиях, связанных с центральной регуляцией сердца. Поскольку основные рефлексy на сердце и сосуды замыкаются на уровне продолговатого или спинного мозга, на этих уровнях регуляция сердечно-сосудистой системы является как бы саморегуляторной, так как в основном базируется на афферентации, приходящей от многочисленных рецепторов сердечно-сосудистой системы. На этом уровне происходит и соразмерность сердечно-сосудистых реакций с активностью систем дыхания и выделения.

Деятельность сердца и сердечно-сосудистой системы должна быть строго согласована с деятельностью всего организма в целом. Это возможно за счет участия в регуляции сердечно-сосудистой системы вышележащих образований го-

ловного мозга. Одной из таких интегративных областей мозга, принимающих большое участие в регуляции сердечно-сосудистой системы, является гипоталамус. Помимо информации, поступающей в спинной и продолговатый мозг, он получает еще ряд дополнительных сведений об интенсивности обмена, теплорегуляции и т. д. Широкий спектр афферентной сигнализации определяет функционирование гипоталамуса как регуляторного центра. Приспособление деятельности сердца применительно к изменениям внешней среды осуществляется корой больших полушарий.

Основной принцип организации адаптивных влияний вышележащих отделов головного мозга проявляется в виде двунаправленной модуляции активности нижерасположенных центров, на уровнях которых замыкаются первичные центральные рефлексy сердечно-сосудистой системы.

Цель работы. Ознакомиться с современными методами исследования центральной регуляции сердца и сосудов и изучить ряд основных механизмов этой регуляции.

Для выполнения задач по данной теме знакомятся с особенностями стереотаксического метода для работы на кошках (см. список литературы № 25), проводят большую предварительную работу по изготовлению электродов, разъема и т. д. и делают несколько манипуляций, являющихся подготовительными для осуществления основных задач. Работа по этой теме логично подразделяется на три этапа. На 1-м этапе проводят вживление раздражающих электродов в гипоталамус, а также вживление электродов для отведения ЭКГ. На 2-м этапе изучают характер ритма сердцебиений у ненаркотизированных нефиксированных кошек и хронотропные эффекты, вызванные у них раздражением гипоталамуса. На 3-м — исследуют центральные механизмы регуляции сердца в условиях острого опыта на наркотизированных животных.

ПОДТЕМА 1. РЕГУЛЯЦИЯ ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ, АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ И ДЫХАНИЯ ПРИ НОРМАЛЬНОМ ПОВЕДЕНИИ НЕНАРКОТИЗИРОВАННОЙ НЕФИКСИРОВАННОЙ КОШКИ И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ НА СЕРДЦЕ У ТАКОГО ЖИВОТНОГО ПРИ РАЗДРАЖЕНИИ ГИПОТАЛАМУСА

Методика. Основные приборы и оборудование. Самописец типа НЗЗ8-6; электроманометр; угольный датчик в эластичном исполнении для регистрации дыхания; усилитель типа УБП1-02 или УБП2-03; стимулятор типа ЭСЛ-1 или ЭСЛ-2; стереотаксический прибор типа СЭЖ-2; бормашина; хирургический стол для кошки; электроды для отведения ЭКГ у ненаркотизированной кошки; микроэлектроды для раздражения гипоталамуса; 7—9 контактный разъем диаметром не более 15—20 мм; металлический зонд с петлей; катетеры для сердца и сонной артерии; маленькие краны для соединения катетеров со шприцами или электроманометром; 2 шприца на 2—5 мл; набор хирургических инструментов (см. тему X); камера с прозрачными стенками для наблюдения за животным в хронических экспериментах; игольчатые электроды для регистрации ЭКГ у наркотизированного животного.

Приготовление металлических микроэлектродов для раздражения гипоталамуса. Из вольфрамовой проволоки диаметром 0,2—0,5 мм делают заготовки длиной 40—50 мм, выпрямляют их и очищают от окислов. Заточку электродов производят следующим

образом: одну или две заготовки периодически опускают на глубину 1—2 мм в насыщенный раствор азотистокислого калия, пропуская через электрод переменный ток 10—15 В. В качестве 2-го электрода служит угольный стержень, погруженный в раствор. Процесс заточки контролируют под микроскопом с окуляр-микрометром.

Затем готовят поверхность электрода к покрытию изолятором: поочередно промывают заготовки 10%-ной КОН, 3%-ной CH_3COOH , растворителем типа толуола или ксилола, 96%-ным этиловым спиртом, водой. Желательно перед покрытием изоляцией погрузить электрод в растворитель, на котором изготовлен изолирующий лак. В качестве покрытия для раздражающих электродов используют лак винифлекс.

Электроды опускают в лак заточенным концом вниз на 25—30 мм, а затем медленно и плавно вынимают. Как только электрод полностью выйдет из лака, его следует перевернуть на 180° и оставить в таком положении на 3—5 мин. Для полимеризации лака электрод погружают в муфельную печь с температурой 150—300° на 10—20 с. Лакировку повторяют 5—6 раз с интервалом 10—20 мин.

Последний этап в приготовлении микроэлектродов — проверка качества лакировки. Для этого покрытую изоляцией часть электрода помещают в физиологический раствор и соединяют электрод через переменное сопротивление с источником постоянного тока с э.д.с. примерно 4 В. Электрод служит катодом. Доказательством хорошего качества лакировки служит выход пузырьков только из кончика микроэлектрода.

Приготовление нихромовых электродов для отведения ЭКГ и оформление разъема. Используют два конца нихромовой проволоки в заводской изоляции диаметром 0,2—0,4 мм. Для одного из электродов длина проволоки 20 см, для другого — 30 см. Припаивают электроды к контактам штепселя разъема. Записывают номера контактов. В дальнейшем зачищенные свободные концы проволочек будут являться электродами для отведения ЭКГ. Соединяют со штепселем разъема два или три раздражающих микроэлектрода. Для этого неизолированную часть электрода освобождают от окисла и плотно обматывают очищенной от изоляции тонкой медной проволокой. 2-й конец проволоки длиной 10—12 см припаивают к свободному контакту разъема. Записывают номера контактов. Припаивают к свободным контактам разъема еще две тонкие проволочки длиной 10—12 см, их в дальнейшем припаивают к шурупам, ввинченным в череп кошки, один из которых будет индифферентным электродом, а второй будет использоваться для заземления животного. Записывают номера контактов. Заливают все контакты горячим воском.

Ко 2-й части разъема — вилке — припаивают провода длиной до 2 м для присоединения вживленных электродов к стимулятору и электрокардиографу. Один из длинных проводов подводят к «земле».

Задача 1. Определение стереотаксических координат

Операцию по вживлению электродов проводят в полустерильных условиях¹. Для опыта берут кошку массой не менее 3 кг.

Методика. 1. Кошке внутрибрюшинно вводят хлоралозу — 60 мг/кг с добавлением 10 мг/кг нембутала (в объеме 7—10 мл).

2. Пока кошка засыпает, определяют нулевые координаты кончика микроэлектрода. Часть разъема (штепсель) с припаянными электродами прикрепляют к вертикальной кремальере держателя так, чтобы он шел строго вертикально и выступал из держателя на 30—35 мм. Определение нуля координат для кончика электрода проводят по трем осям координат стереотаксического прибора, соответствующим нахождению кончика микроэлектрода в той части мозга, которая условно принята за нулевую, т. е. за точку пересечения нулевых стереотаксических координат. За фронтальный нулевой план AP_0 стереотаксических координат принимают вертикальную плоскость, проходящую через линию, соединяющую центры наружных слуховых проходов, т. е. через центры окончаний ушных держателей.

В качестве сагиттального нулевого плана LR_0 принимают вертикальную плоскость, проходящую по средней линии сагиттальной линии черепа. За нулевой горизонтальный план H_0 принята плоскость, лежащая параллельно основному плану, в качестве которого взята плоскость, проходящая через центры наружных слуховых проходов и самые нижние точки нижних поверхностей орбит, но на 10 мм выше ее (см. рис. 97). Определяют координаты основного и фронтального нулевых планов при подведении кончика электрода к середине кончика ушного держателя. Вычисляют нулевую координату горизонтального плана. Определяют координату нулевого сагиттального плана после закрепления головы кошки. Записывают определенные координаты.

3. У заснувшего животного (исчезновение роговичного рефлекса) записывают ЭКГ в течение 30 с. Для записи используют игольчатые электроды, вколотые подкожно, — один в область грудины, другой — под ним на спине. Третий электрод (заземляющий) вкалывают в заднюю лапу.

Ход работы. 1. Выстричь большими ножницами Купера шерсть на голове животного и смазать кожу иодом и спиртом.

2. Приподняв с помощью большого анатомического пинцета как можно выше кожу, вырезать ножницами круглый лоскут кожи диаметром 1,5—2 см, границами которого служат передние и задние края ушей.

3. Перевернуть кошку брюшной стороной вверх и выстричь шерсть на шее.

¹ Необходимо провести спиртовую стерилизацию инструментов, катетеров, электродов, шелка, шурупов, а в дальнейшем и спиртовую обработку операционных полей — головы кошки, шеи, грудины, области лопаток.

4. Отпрепаровать наружную яремную вену и одну сонную артерию (см. тему X).

5. Венозный и артериальный катетеры, заполненные физиологическим раствором с гепарином (1 мл гепарина — 5000 МЕ на 10 мл раствора) и соединенные с краниками, провести подкожно со стороны черепа к разрезу на шее так, чтобы краники оставались около черепа.

6. Ввести венозный катетер в сердце так, как это описано в пункте 8 препаровки темы X.

7. Ввести артериальный катетер для регистрации АД так, как это описано в пункте 9 препаровки темы X при регистрации АД в бедренной артерии. В данном случае катетер ввести в периферический конец сонной артерии, ближе к сердцу.

8. Рану засыпать стрептоцидом, зашить и на поверхность шва наложить жгут со стрептоцидом.

9. Сделать два небольших разреза (0,5 см) кожи сбоку грудной клетки и у грудины. Между разрезами подкожно провести угольный датчик для регистрации дыхания (см. тему X); концы проводов от датчика провести подкожно до разреза на поверхности черепа и припаять к соответствующим контактам разъема.

10. Кошку перевернуть спиной вверх, череп фиксировать в 5 основных точках: двумя ушными держателями, вводимыми в наружные слуховые проходы; двумя глазными держателями, накладываемыми на нижние точки орбит, и опорой верхней челюсти (опорную дужку заводят за верхние клыки).

11. Установить такой наклон головы, который соответствует основному стереотаксическому плану.

12. Определить нулевой сагиттальный план и записать координату.

13. С помощью термокаутера или ножницами удалить с черепа подкожную клетчатку.

14. Распатором отсепаровать мышцы и отодвинуть их к краям раны. Череп должен быть очищен на протяжении 1,5—2 см, считая от затылочной кости.

15. Для прочной фиксации электродов и разъема распатором тщательно очистить поверхность черепа от надкостницы и протереть 5—10%-ным раствором перекиси водорода.

16. В связи с тем, что в данной задаче будут вводиться два электрода в мозг, на поверхности черепа следует отметить референтную точку, локализирующуюся в месте пересечения нулевых координат фронтального и сагиттального планов.

17. Записать вертикальную координату этой точки; вычислить расстояние от этой точки до нулевого горизонтального плана. Зная этот параметр, в дальнейшем будет легко определить нулевой горизонтальный план для 2-го электрода.

18. Для вживления электродов в гипоталамус отметить две точки с координатами A-13; R-2,5—3,5; A-10; L-1,2. В намеченных точках с помощью крупного бора (около 2 мм в диаметре) просверлить трепанационные отверстия. Для предотвращения травмы

мозга бор не должен выходить из зажима более чем на 4 мм. В месте введения электрода вскрыть твердую мозговую оболочку мозга, поддев ее хирургической или инъекционной иглой. При возникновении сильного кровотечения отверстие закрыть ватным тампоном, смоченным в 2—4%-ном растворе перекиси водорода.

19. Прежде чем приступить к погружению электрода, ввернуть в кость черепа два маленьких шурупа, один из которых будет служить индифферентным электродом, а второй используется для заземления кошки в хроническом эксперименте. Для этого симметрично референтной точке, на расстоянии 10 мм от нее, просверлить два трепанационных отверстия (диаметр бора приблизительно 0,5 мм, чуть меньше диаметра шурупа), в которые и заворачивают шурупы. Шурупы улучшают фиксацию разъема на черепе.

20. К индифферентному электроду припаять проволочку, соединяющую ее с разъемом. *Во время пайки паяльник должен быть выключен из сети!*

21. Соединить обе части разъема. Подсоединить соответствующие провода к изолирующему трансформатору стимулятора (активный электрод должен быть катодом).

Задача 2. Вживление раздражающих электродов

Ход работы. 1. После того, как все подготовлено для раздражения, отлажены записи ЭКГ, АД и дыхания (см. предыдущую тему), электрод в соответствии с координатами А-13 и R-2,5 подвести к поверхности мозга и постепенно погружать в ткань до достижения точки, расположенной на 2 мм ниже уровня нулевого горизонтального плана (Н-2).

2. Начать «поиск» «активной» точки, с которой возникает изменение ритма сердцебиений: электрод погружать с шагом 0,25 мм, начиная от точки, расположенной на 1—2 мм выше заданной вертикальной координаты. После каждого шага электрода давать раздражение. Параметры стимуляции: 5—7 В; 100 имп/с; 0,08 мс; время раздражения 5 с; интервал между раздражениями 2 мин.

3. После нахождения точки, с которой получен хронотропный эффект на сердце, закрепить электрод зубной пластмассой.

4. Через 10—20 мин после затвердения пластмассы освободить электрод из держателя.

5. Закрепить в держателе 2-й раздражающий электрод и подвести его кончик к референтной точке.

6. Записать координату его нулевых стереотаксических планов.

7. Вычислить координаты нулевого горизонтального плана. Для этого к вертикальной координате кончика (расстояние до черепа) прибавить вычисленное расстояние от референтной точки черепа до нулевого плана.

8. Ввести 2-й электрод по координатам: А-10; L-1,2; Н-5.
9. Повторить все манипуляции, описанные для 1-го электрода (пункты 1—4).

Задача 3. Закрепление разъема и вживление электродов для отведения ЭКГ

Ход работы. 1. Для фиксации разъема приготовить примерно 5 см³ зубной пластмассы. Поверхность черепа протереть 10—20%-ным раствором перекиси водорода и насухо вытереть.

2. Припаять проволочку ко 2-му шурупу (паяльник во время пайки должен быть выключен из сети!), служащему для заземления.

3. Установить разъем по середине между шурупами так, чтобы электроды для регистрации ЭКГ были повернуты к хвосту животного.

4. Обмазать разъем пластмассой со всех сторон, за исключением той области, где выходят отводящие ЭКГ электроды.

5. Во время затвердения пластмассы подготовить участки для вживления электродов. Большими ножницами Купера состричь шерсть в области грудины и над ней на спине.

6. Протереть кожу спиртом и смазать иодом.

7. Сделать в этих местах разрезы кожи длиной около 1 см каждый.

8. После затвердения пластмассы приступить к протягиванию электродов под кожей. Для этого в разрез, сделанный на спине животного, ввести металлический зонд с петлей на конце, который подкожно вывести в разрез на голове кошки. В петлю вставить отводящие электроды и, загнув их концы, вывести зонд в разрез на спине.

9. Затем зонд вставить в разрез на груди и, проведя его подкожно в разрез на спине, вывести более длинный электрод на грудину.

10. Сильно натянув электроды, снять изоляцию до места выхода их из раны.

11. Пришить электроды хирургической иглой к подкожной клетчатке. Лишнюю проволоку «откусить».

12. Наложить на кожные разрезы кетгутом по одному шву. Рану залить медицинским клеем БФ.

13. Соединить обе части разъема и проверить качество записи ЭКГ. Разъем разъединить.

14. Зубной пластмассой зафиксировать краники.

15. Животному внутримышечно ввести антибиотик в дозе 200—300 единиц.

16. Вынуть кошку из стереотаксического прибора и поместить в теплую клетку.

Все последующие задачи проводят в условиях хронического эксперимента через 2—5 дней после операции. Кошку предварительно немного накормить.

**Задача 4. Регистрация ЭКГ, АД и дыхания
у ненаркотизированной нефиксированной кошки
в покое и во время еды**

Ход работы. 1. Поместить кошку в камеру с прозрачными стенками.

2. Соединить обе части разъема.

3. К крану от венозного катетера подсоединить шприц, а кран от артериального катетера соединить с электроманометром.

4. Подключить соответствующие провода к самописцу и стимулятору.

5. Записать ЭКГ, АД и дыхание у спокойно сидящей кошки.

6. Дать кошке кусочек сырой рыбы или сырого мяса и записать ЭКГ во время еды.

**Задача 5. Определение характеристик эффекта
при раздражении гипоталамуса**

Ход работы. 1. Определить пороговую силу эффекта на сердце, возникающего при раздражении 1-й точки гипоталамуса.

2. Определить зависимость эффекта на сердце от частоты раздражения — 20, 40, 60 и 100 имп/с (длительность раздражающего стимула 0,08 мс, напряжение на 20% выше порогового, длительность раздражения 2—5 с).

3. Определить зависимость эффекта от длительности стимула — 0,08; 0,2 и 1 мс (частота стимуляции 60 имп/с, напряжение на 20% выше порогового).

4. Определить характер поведенческой реакции при раздражении 1-й точки: применить силу раздражения, превышающую вдвое пороговую величину, частоту раздражения 100 имп/с и длительность стимула 1 мс.

5. Повторить все процедуры, описанные в пунктах 1—4, при раздражении 2-й точки гипоталамуса.

**Задача 6. Изучение влияния имитации увеличения
венозного притока на ЧСС, АД и дыхание
у ненаркотизированной кошки**

Повторить задачу 1 предыдущей темы.

**Задача 7. Изучение влияния раздражения гипоталамуса
на хронотропные эффекты, вызванные введением
дополнительного объема крови в сердце**

Ход работы. 1. Получить стабильный эффект на сердце при введении 1—5 мл крови (2—3 раза).

2. Повторить введение крови на фоне подпорогового раздражения одной из точек гипоталамуса.

3. Повторить введение крови через 3—5 мин после совместного раздражения.

Задача 8. Фармакологический анализ изучаемых эффектов

Ход работы. 1. Через венозный катетер ввести бета-адреноблокатор обзидан (1,5—2 мг/кг в объеме 3—7 мл).

2. Через 15—20 мин повторить раздражение гипоталамуса (см. задачу 5).

3. Исследовать изменение ЧСС при еде (см. пункты 4, 5 задачи 4).

4. Повторить задачу 6.

5. Повторить задачу 7.

Обработка результатов. Сопоставляют ЧСС, АД и дыхание у наркотизированных и ненаркотизированных кошек. Обращают внимание на изменение характера ЭКГ при еде. Сопоставляют ЧСС при еде до и после выключения бета-адренорецепторов. Строят график зависимости эффекта от частоты стимуляции гипоталамуса и кривую «сила — длительность». Описывают характер хронотропного эффекта на сердце при раздражении структур гипоталамуса (обращают внимание на латентность). На основании результатов экспериментов с введением адреноблокатора объясняют природу полученных реакций при раздражении гипоталамуса. Описывают характер поведенческих реакций, возникающих при пороговых и надпороговых раздражениях гипоталамуса. Сопоставляют характер поведенческой реакции со стимулируемой областью гипоталамуса (исходя из стереотаксических координат и стереотаксического атласа мозга кошки).

ПОДТЕМА 2. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ НА СЕРДЦЕ ПРИ РАЗДРАЖЕНИИ ГИПОТАЛАМУСА И ВЫЯВЛЕНИЕ МОДУЛИРУЮЩИХ ВЛИЯНИЙ ГИПОТАЛАМУСА НА СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫЕ РЕФЛЕКСЫ У НАРКОТИЗИРОВАННЫХ КОШЕК

Настоящий этап работы проводят после завершения исследования на ненаркотизированном животном.

Методика. Основные приборы и оборудование. Самописец типа НЗ38-6 или электрокардиограф типа ЭЛКАР-6; усилитель типа УБП1-02 или УБП2-03; два стимулятора типа ЭСЛ-1 или ЭСЛ-2; раздражающие биполярные электроды проволочные; два шприца на 1—10 мл; хирургический стол; цепь для отметки раздражения; набор хирургических инструментов (см. тему X); вторая часть разъема с длинными проводами для подсоединения к самописцу, стимулятору и «земле»; электроманометр.

Препаровка. 1. Кошке внутрибрюшинно вводят раствор хлоралозы 50—60 мг/кг и нембутал 10 мг/кг массы в объеме 7—10 мл (можно внутривенно через венозный катетер).

2. Уснувшее животное кладут на хирургический стол брюшной стороной вверх. Делают разрез термокаутером или скальпелем около шва на шее и отсепааровывают кожу с двух сторон.

3. Выделяют оставшуюся интактной сонную артерию на протяжении 3—4 см и подводят под нее лигатуры, не затягивая их.

4. Отпрепаровывают блуждающие нервы на шее (см. тему X) и накладывают на них лигатуры, не затягивая.

6. Соединяют обе части разъема.

7. Отлаживают записи ЭКГ, АД и дыхания (используют катетер, датчик и электроды, вживленные в задачах 1—3 подтемы 1). Отлаживают и проверяют систему раздражения гипоталамуса. Налаживают отметку раздражения.

Задача 1. Определение характеристик гипоталамических эффектов на ЧСС, АД и дыхание при раздражении гипоталамуса

Ход работы. 1. Соединить выход стимулятора (прямой или через трансформатор) с 1-м раздражающим электродом.

2. Определить пороговое напряжение для вызова эффекта на сердце и АД: частота раздражения 60 имп/с, длительность стимула 0,08 мс.

3. Увеличить напряжение на 20% против порогового и определить частотную характеристику эффектов, применяя частоты 20, 40, 60, 80, 100 и 120 имп/с.

4. Зарегистрировать эффекты на сердце и давление при изменении длительности стимула: 0,08; 0,2 и 1 мс при напряжении на 20% выше порогового, частоте — 70 имп/с.

5. Повторить все процедуры, описанные в пунктах 1—4, для раздражения 2-й точки.

Задача 2. Регистрация изменений ЧСС и АД при пережатии сонных артерий

Задачу выполняют так же, как задачу 2 темы X.

Задача 3. Регистрация изменений ЧСС, АД и дыхания при введении в сердце дополнительного объема раствора или крови

Записать изменения ЧСС, АД и дыхания при введении в сердце 0,5 и 1,5 мл раствора или крови комнатной температуры и температуры тела животного (36—38°C) с последующим выведением равного объема крови (см. задачу 1 темы X).

Задача 4. Модулирующие влияния гипоталамуса на эффекты, возникающие при двустороннем пережатии сонных артерий

Ход работы. Пережать сонную артерию при подпороговом, пороговом и надпороговом раздражении гипоталамуса (желательно всех двух точек гипоталамуса). Дополнительно сделать пережатие не одновременно со стимуляцией гипоталамуса, а сразу же после прекращения раздражения гипоталамуса.

Задача 5. Модулирующие влияния гипоталамуса на эффекты, возникающие при имитации увеличения венозного притока в сердце

Ход работы. 1. Ввести в сердце 0,5 и 1,5 мл раствора или крови комнатной температуры и температуры тела животного (36—38°C) на фоне раздражения гипоталамуса и сразу после прекращения стимуляции гипоталамуса.

2. Изучить влияние гипоталамуса на эти рефлексy при раздражении всех двух точек гипоталамуса.

Задача 6. Исследование изменений ЧСС и АД при раздражении центрального конца блуждающего нерва на шее

Ход работы. На правом блуждающем нерве туго затянуть наложенные ранее лигатуры; нерв между ними перерезать и положить центральный конец на раздражающие электроды.

2. Получить зависимость эффектов на ЧСС и АД при вариации напряжения стимулов от 0,5 до 5 В при частоте стимуляции 20 имп/с, длительности стимула 0,01 мс и времени раздражения 3 с.

3. Изучить зависимость эффектов от частоты стимуляции: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 70 и 100 имп/с при напряжении стимулов на 20% выше порогового, длительности стимула 0,1 мс и времени раздражения 2 с.

4. Изучить зависимость эффектов от длительности раздражающего стимула — 0,08; 0,1; 0,2 и 0,5 мс при частоте стимуляции 20 имп/с и напряжении стимулов на 20% выше порогового.

Задача 7. Исследование изменений ЧСС и АД при раздражении периферического конца блуждающего нерва на шее

Ход работы. Положить на раздражающие электроды периферический конец блуждающего нерва и повторить манипуляции, описанные в пунктах 2—4 задачи 6.

Задача 8. Исследование влияния гипоталамуса на эффекты, возникающие при раздражении центрального конца блуждающего нерва на шее

Ход работы. 1. Осуществить одновременное раздражение центрального конца блуждающего нерва и гипоталамуса пороговыми силами: частота стимуляции нерва 20 имп/с, гипоталамуса — 70; длительность стимула при раздражении нерва 0,2 мс, гипоталамуса — 0,08. Исследовать 1-ю точку гипоталамуса.

2. Зарегистрировать изменения ЧСС и АД при последовательном пороговом раздражении блуждающего нерва и гипоталамуса: раздражать блуждающий нерв сразу после прекращения стимуляции гипоталамуса (параметры стимуляции те же, что в пункте 1).

3. Зарегистрировать изменения ЧСС и АД при одновременном раздражении центрального конца блуждающего нерва пороговым напряжением и подпороговым раздражении гипоталамуса.

4. Зарегистрировать изменения ЧСС и АД при последовательном раздражении блуждающего нерва и гипоталамуса: раздражать блуждающий нерв подпороговыми силами сразу после прекращения раздражения гипоталамуса пороговым напряжением.

5. Повторить пункты 3 и 4, используя надпороговые силы раздражения гипоталамуса (на 20% выше пороговой).

6. Повторить пункты 3 и 4, используя надпороговое раздражение блуждающего нерва (на 20 и 50% выше порогового значения).

7. Повторить манипуляции, описанные в пунктах 1—6 для раздражения 2-й точки гипоталамуса.

Задача 9. Исследование возможности модулирующих влияний гипоталамуса на реакции сердца и АД, возникающие при стимуляции периферического конца блуждающего нерва

Раздражая периферический конец блуждающего нерва, повторить манипуляции, описанные в пунктах 1 и 2 задачи 8.

Задача 10. Исследование путей нервных влияний на сердце, возникающих при раздражении гипоталамуса

Ход работы. 1. Ввести внутривенно бета-адреноблокатор обзидан (1,5—2 мг/кг в объеме 3—7 мл).

2. Через 15 мин повторить раздражение 1-й точки гипоталамуса силой, на 20 и 50% превышающей пороговое значение: частота стимуляции 70 имп/с; длительность стимула 0,08 мс; время раздражения 2 с.

3. Повторить пункт 2 для раздражения 2-й точки гипоталамуса.

4. Перерезать 2-й блуждающий нерв на шее.

5. Через 10 мин повторить манипуляции, описанные в пунктах 2—4.

Обработка результатов. Описывают общий вид ЭКГ, АД и дыхания; рассчитывают исходные величины ЧСС и АД, систолического и диастолического давлений. Сопоставляют ЧСС и уровень АД у наркотизированного и ненаркотизированного животного. Объясняют механизм эффектов, возникающих при пережатии сонных артерий. Описывают эффекты на сердце и АД при раздражении разных точек гипоталамуса и сопоставляют их с эффектами, возникавшими во время вживления электродов в 1-й подтеме данной темы. Сопоставляют эффекты на сердце и давление при раздражении одной и той же точки гипоталамуса у наркотизированного и ненаркотизированного животного. Выявляют первичность и вторичность сердечных и сосудистых эффектов. Сопоставляют эффекты от раздражения центрального и периферического концов блуждающих нервов в исходном состоянии и при одновременном или последовательном раздражении гипоталамуса. Сравнивают эффекты от пережатия сонных артерий в исходном состоянии и при одновременном и последовательном раздражении гипоталамуса. Сопоставляют эффекты на сердце и АД, возникающие при имитации увеличения венозного притока, в исходном состоянии и на фоне одновременного или последовательного раздражения гипоталамуса. Выявляют различия в возможности получения модулирующих влияний гипоталамуса на все исследованные типы реакций сердца и АД. Определяют возможность центрального и периферического взаимодействий. Объясняют предположительный механизм изменения ЧСС после перерезки правого нерва и последующей перерезки левого. Сопоставляют характеры возникающих гипоталамических эффектов с локализацией стимуляции (по стереотаксическим координатам и атласам).

Рекомендуемая литература: [5] — с. 383—388, 421—426; [25]; [26] — с. 130—155, 181—189; [30]; [48] — с. 505—523; [50].

ТЕМА XII. НЕЙРОГЕННАЯ АВТОМАТИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СЕРДЕЦ АМФИБИЙ

В организме наряду с системой кровеносных сосудов имеется система лимфатических сосудов. Согласованная работа систем крово- и лимфообращения необходима для процесса циркуляции жидкости и включенных в нее веществ, который осуществляется по схеме: кровеносные капилляры — межклеточное пространство — лимфатическая система — кровяное русло. Основная функция лимфатической системы заключается в перекачивании жидкости с содержащимися в ней веществами самой различной природы (белки, эмульсии липидов, взвеси инородных веществ, бактерии и др.) из межтканевых пространств в кровеносную систему. Лимфатическая система играет также большую роль в иммунобиологических реакциях организма. Оттекающая от тканей жидкость, двигаясь по лимфатическим сосудам, проходит через биологические фильтры — лимфатические узлы, в которых задерживаются и обезвреживаются проникшие в организм чужеродные частицы.

Движение лимфы по лимфатическим сосудам осуществляется с помощью нескольких механизмов. В транспорте лимфы большое значение имеет наличие отрицательного давления в грудной полости, возникающее при увеличении объема грудной клетки в период вдоха. Это вызывает расширение грудного лимфатического протока и засасывание лимфы из лимфатических сосудов, расположенных в верхней и нижней частях тела. Движению лимфы, как и венозной крови, способствуют мышечные сокращения, возникающие при работе, ходьбе и т. д. Наличие клапанов в лимфатических сосудах обеспечивает движение лимфы только в одном направлении.

Важную роль в механизме перемещения лимфы играют ритмичные сокращения стенок некоторых лимфатических сосудов. Особенно четко способность к постоянной ритмической активности выражена у самого крупного лимфатического сосуда — грудного протока. Благодаря сильным ритмичным сокращениям стенок грудного протока облегчается поступление лимфы в этот проток и ее перекачивание небольшими порциями в левую плечевую вену.

По мнению ряда исследователей, грудной проток правильнее называть *вторым сердцем, лимфатическим*. Так, грудной проток у человека, достигающий в длину 45 см, способен к постоянной, сложно организованной ритмической активности. Кроме того, у некоторых низших позвоночных — амфибий и рептилий — существуют специальные лимфатические сердца.

В настоящую тему включены задачи, посвященные физиологии лимфатических сердец лягушки. При выполнении задач предыдущих тем студенты имели возможность глубоко изучить основные закономерности миогенной автоматии кровяного сердца и механизмы его нервной и гуморальной регуляции. Лимфатическое сердце лягушки по характеру активности во многом сходно с кровяным сердцем. Оно также представляет собой ритмично сокращающийся мышечный орган, однако механизм сокращений мышцы лимфатического сердца принципиально иной.

Ритмика сокращений лимфатического сердца определяется *ритмоводителем*, локализованным в спинном мозге и представляющим собой группу нейронов, обладающую автоматией.

Таким образом, автоматия лимфатического сердца лягушки имеет *нейрогенную* природу. Для того чтобы понять механизмы возбуждения мышцы лимфатического сердца, необходимо изучить структурно-функциональную организацию спинального центра лимфатического сердца — *лимфатического центра*. Расположение центра автоматии лимфатического сердца в спинном мозге обусловило особую форму регуляции активности этого сердца, принципиально отличную от механизмов регуляции деятельности кровяного сердца.

Лимфатические сердца амфибий — специализированные ритмично сокращающиеся мышечные образования, деятельность которых способствует передвижению лимфы в венозную систему и обеспечивает постоянное соотношение между объемом крови в сосудах и количеством межклеточной жидкости.

У лягушки имеется две пары лимфатических сердец. Мышца лимфатического сердца принадлежит к числу тонических скелетных мышц. Верхние, или передние, сердца расположены симметрично по обе стороны позвоночника на уровне 3—5-го позвонков, нижние, или кончиковые, локализованы также симметрично по обе стороны от нижнего конца уростиля.

Ритмичная активность центров при изоляции тех сегментов спинного мозга, в которых они расположены, сохраняется в течение многих часов. Автоматическая ритмичная активность лимфатических центров обеспечивает ритмику сокращений лимфатических сердец.

В лимфатическом центре лягушки ритмоводитель представлен промежуточными нейронами спинного мозга, а эфферентное звено — мотонейронами (рис. 147). Спонтанно возникающие в нейронах ритмоводителя возбуждения передаются мотонейронам. Аксоны мотонейронов лимфатического центра образуют единый лимфатический нерв, который покидает спинной мозг в составе IX, X и XI передних корешков и подходит к мышце лимфатического сердца. Ритм возникающих в ритмоводителе всплесков возбуждения определяет ритм сокращений лимфатических сердец, в среднем он составляет 35—45 сокращений/мин. Однако с помощью регуляторных механизмов он может меняться в широких пределах. Так, И. М. Сеченов (1863) при наложении кристалла NaCl на попе-

речный разрез промежуточного мозга наблюдал торможение ритма сокращений лимфатических сердец. Деятельность лимфатических сердец может быть рефлекторно заторможена при возбуждении механорецепторов различных внутренних органов — желудка, кишечника, легких, мочевого пузыря, дуги аорты.

На кафедре физиологии человека и животных МГУ впервые было установлено, что с механорецепторов внутренних органов можно получить *рефлекторную стимуляцию* ритма сокращений лимфатических сердец. Как видно из рис. 148, А, Б, все рефлекторные влияния направляются в спинной мозг к ритмоводителю лимфатического центра, урежая или учащая ритм спонтанно возникающих в нем возбуждений, что влечет за собой изменение ритма сокращений лимфатических сердец.

Удобную модель для изучения механизмов рефлекторной регуляции нейрогенного ритма сокращений лимфатических сердец лягушки представляют тормозные и стимулирующие рефлексы, возникающие в механорецепторах стенки желудка. Стимулирующий рефлекс принадлежит к числу спинальных висцеромоторных рефлексов. Афферентные волокна рефлекторной дуги этого рефлекса идут от желудка в составе чревного нерва и входят в спинной мозг в составе 5—7-го дорсальных корешков. Далее по интраспинальным путям афферентные импульсы доходят до нейронов лимфатического центра.

Тормозной рефлекс принадлежит к числу спино-бульбо-спинальных рефлексов. Афферентные пути этого рефлекса идут от рецепторов желудка в составе тех же нервов, что и афферентные пути стимулирующего рефлекса. По восходящим спинальным путям афферентные импульсы доходят до нейронов РФ и затем по нисходящим ретикуло-спинальным путям подходят к пейсмекеру лимфатического центра, вызывая его торможение по постсинаптическому типу (рис. 148, А). Торможение деятельности лимфатического центра при раздражении желудка можно получить только у бульбарной лягушки. Стимулирующие влияния на лимфатический центр при раздражении желудка обнаруживаются

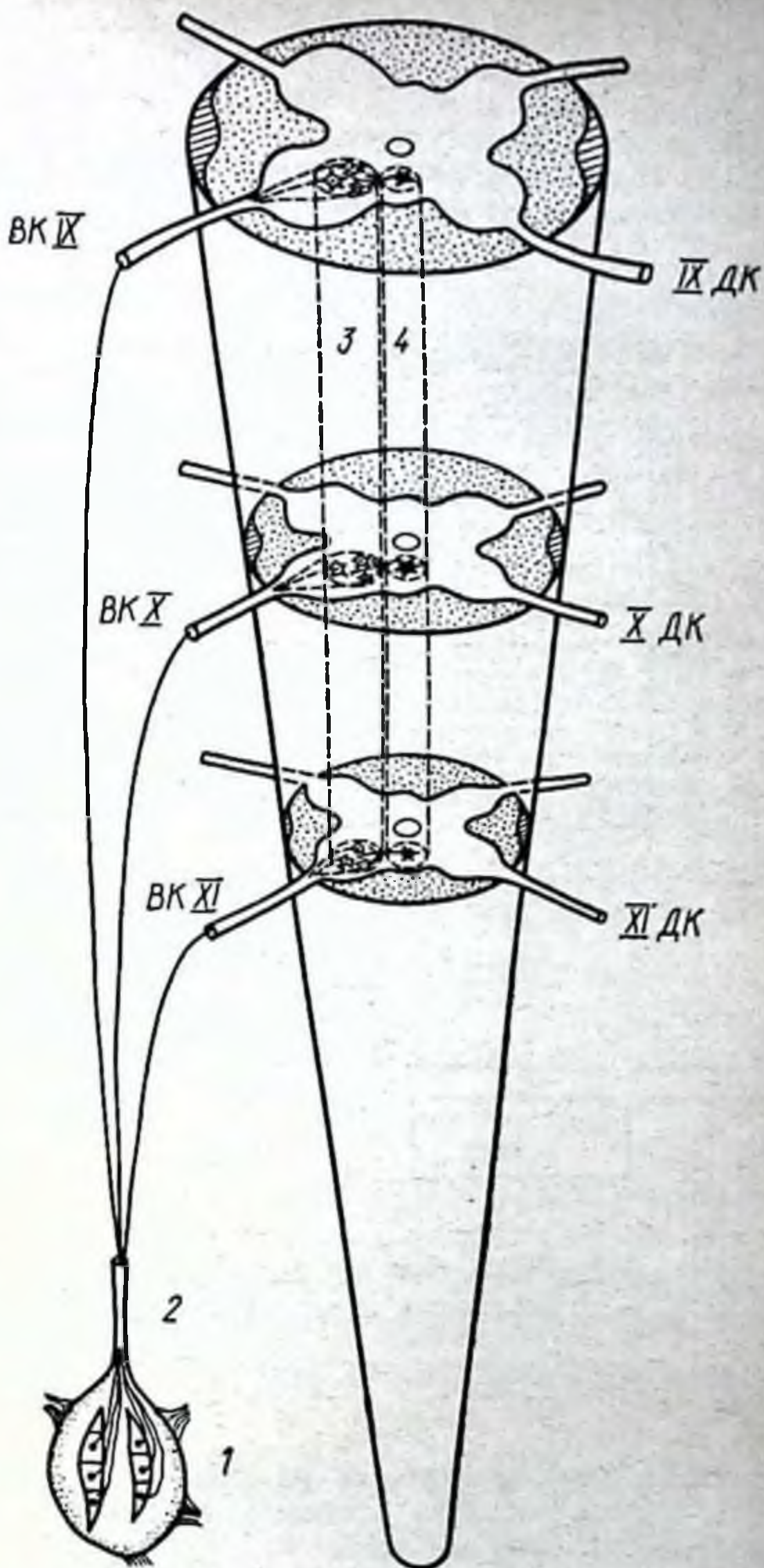


Рис. 147. Локализация спинального центра одного из нижних лимфатических сердец лягушки:

1 — лимфатическое сердце, 2 — лимфатический нерв, 3 — область мотонейронов центра, 4 — область промежуточных нейронов ритмоводителей; ВК — вентральные, передние, ДК — дорсальные, задние корешки

только у спинальных лягушек. Эти факты объясняются тем, что при раздражении желудка бульбарных животных одновременно включаются два рефлекса — возбуждающий и тормозной, соответственно в пейсмерных структурах лимфатического центра сталкиваются два процесса. Тормозной процесс является более сильным, и возбуждающие влияния не могут довести уровень мембранного потенциала до пороговой величины. У спинальных животных тормозной реф.

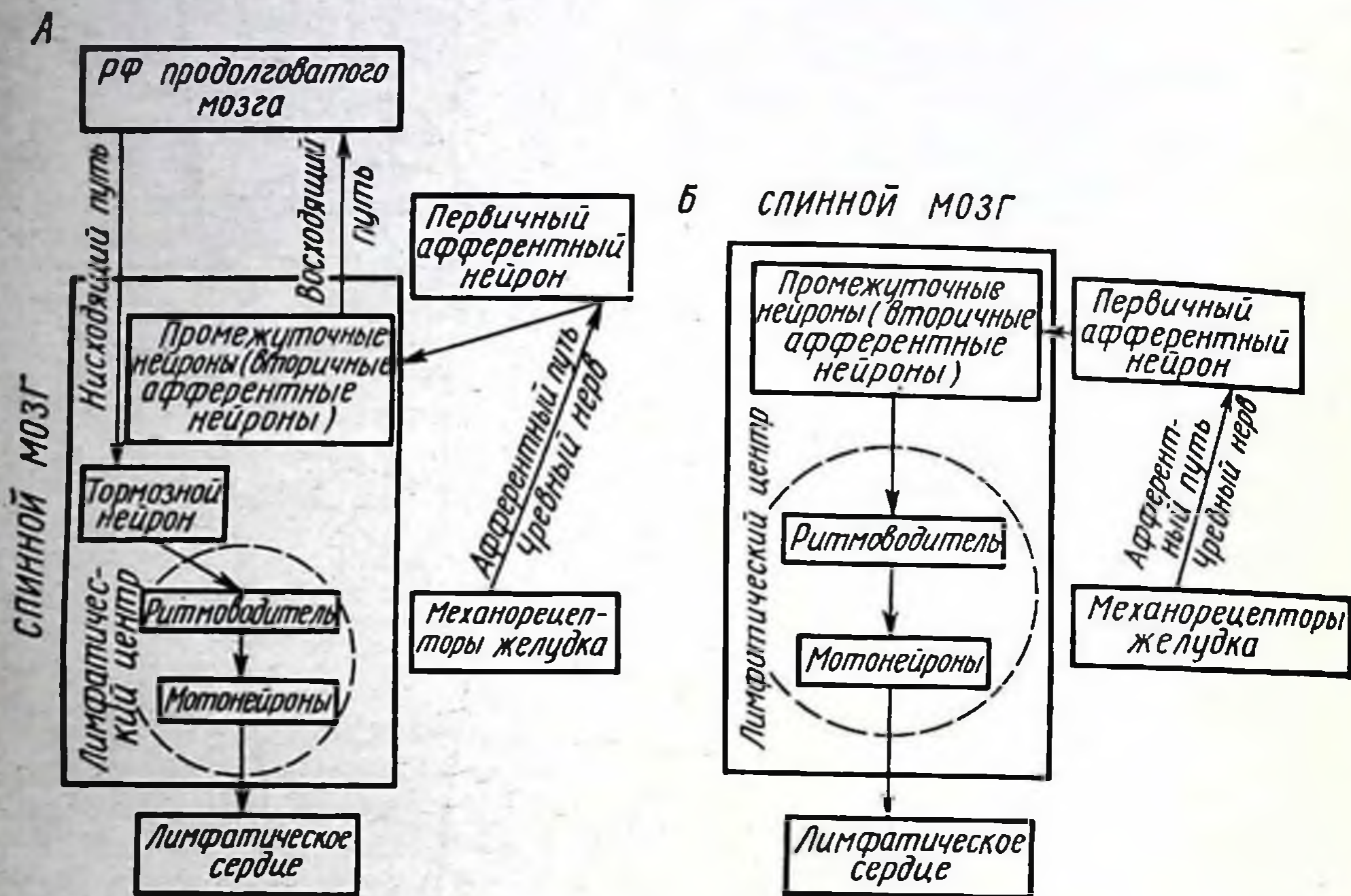


Рис. 148. Рефлекторная регуляция деятельности лимфатического сердца. А, Б — тормозные и стимуляторные рефлекторные влияния с механорецепторов желудка

лекс (который замыкается на уровне продолговатого мозга) не может возникнуть, поэтому в этих условиях легко проявляется возбуждающий рефлекс с механорецепторов желудка.

Задача по изучению рефлекторной регуляции деятельности лимфатических сердец включает выполнение нескольких опытов.¹

Цель работы. Ознакомиться с механизмами регуляции нейрогенной автоматии лимфатических сердец лягушки. Получить и зарегистрировать феномен «усвоения ритма» на авторитмично функционирующем лимфатическом центре лягушки. Определить ритм сокращения лимфатических сердец лягушки при искусственном возбуждении лимфатического центра стимулами высокой частоты.

¹ Как и многие задачи настоящего практикума, предлагаемые в разделе задачи разработаны сотрудниками кафедры и публикуются впервые.

Задача 1. Рефлекторная регуляция деятельности лимфатических сердец лягушки

Опыт 1. Регистрация рефлекторного торможения лимфатического сердца лягушки

Методика. Основные приборы и оборудование. Используют тензодатчики (2ПКП-10-200 ГВ); тензоусилитель TDA-3; самописец типа КСП-4; стимулятор типа ЭСЛ-2; игольчатые электроды; препаровальная пластинка; набор инструментов; миниатюрный серфин; вата; марля; физиологический раствор для холоднокровных. Применяют в случае регистрации сокращений лимфатического сердца на кимографе: кимограф, универсальный штатив, рычаг Энгельмана с легким длинным писчиком.

Приготавливают тензодатчики (тензодатчики предназначены для преобразования механических колебаний в электрические). Они представляют собой очень тонкие металлические проводники, змееобразно уложенные между изолирующей бумажной или полиэтиленовой прокладкой. Любой резкий перегиб пластинки с датчиком может привести к разрыву в проводящей цепи, поэтому работа с тензодатчиком требует исключительной осторожности.

Датчики сопротивления 180—200 Ом склеивают попарно клеем БФ-2 при строгом совмещении одного с другим (между датчиками помещают полоску фотопленки), затем высушивают в течение 8—10 ч. Два датчика необходимы потому, что каждый регистрирует колебания, происходящие в одном направлении. Сокращающееся лимфатическое сердце, подтянутое нитью серфина, в фазу систолы оттягивает пластину датчика вниз, в фазу диастолы датчик возвращается в исходное положение гибкой пластиной (полоска фотопленки). За ее расщепленный конец закрепляют нить от серфина. Подключение датчиков в цепь производят последователь-

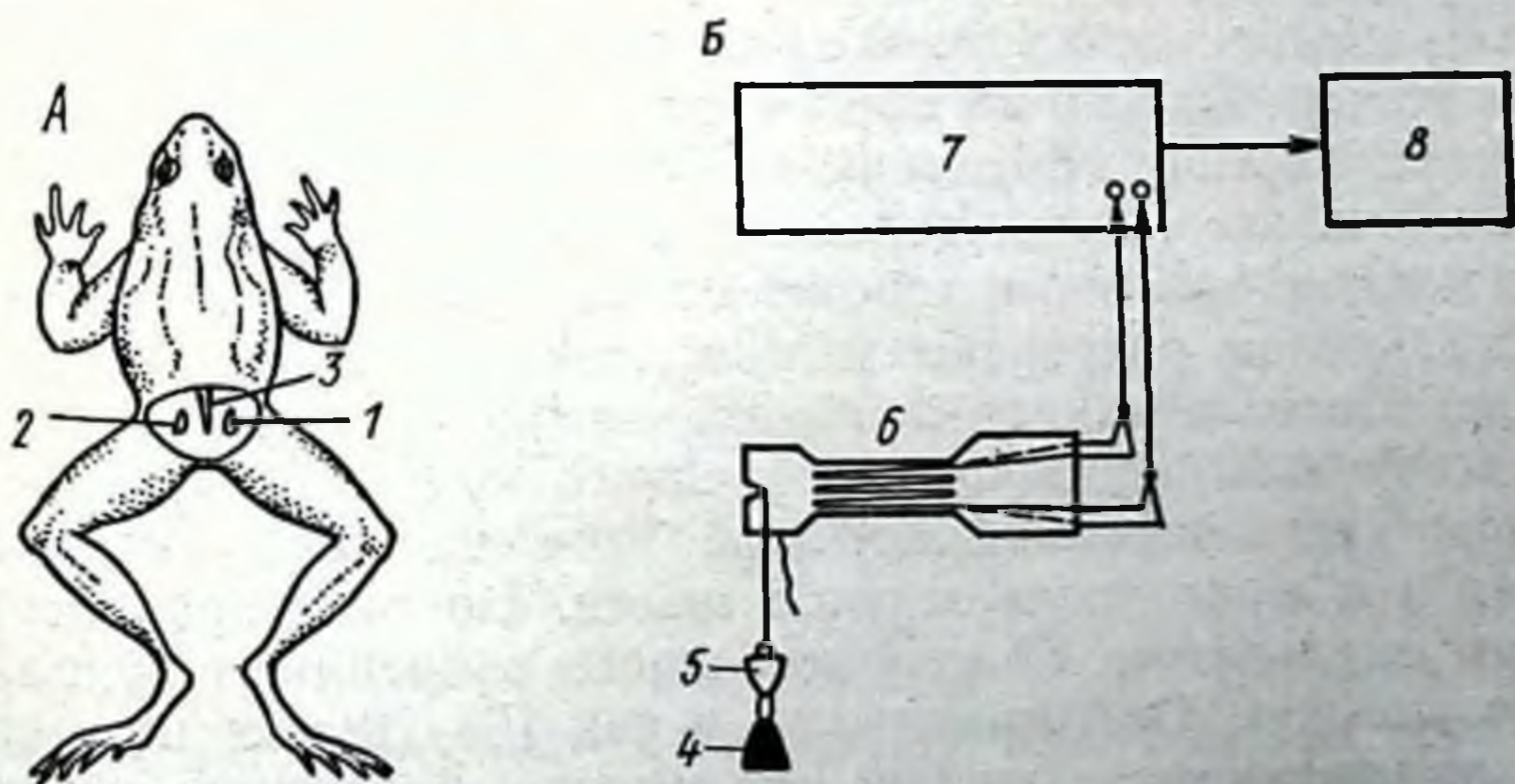


Рис. 149. Регистрация сокращений лимфатического сердца. А — расположение нижних лимфатических сердец (1, 2); Б — установка для регистрации:

3 — уростиль (удален кожный лоскут), 4 — лимфатическое сердце, 5 — серфин, 6 — тензодатчик, 7 — усилитель TDA-3, 8 — самописец

но; для этого к выходным концам датчика припаивают тонкие проводники, идущие на клеммы усилителя (рис. 149, Б).

Потенциометр КСП-4, как и приборы подобного типа, предназначен для измерения различных величин, изменения значения которых могут быть преобразованы либо в изменение напряжения, либо силы постоянного тока, либо сопротивления.

До начала работы знакомятся с техническим описанием прибора и порядком работы. Проверяют заземление, присоединяют прибор к усилителю *TDA-3* (рис. 149, Б), наполняют чернилами резервуар. Состав чернил должен соответствовать рецепту, приведенному в описании прибора. Чернильницу заполняют на 90% ее объема и закрывают пробкой с капилляром так, чтобы он касался дна флакона. Создают давление внутри флакона с помощью резиновой груши. Включают прибор в сеть за 15—20 мин до начала работы.

Устанавливают диаграммную ленту в соответствии с инструкцией. Скорость движения бумажной ленты подбирают в зависимости от собственной частоты сердечных сокращений и так, чтобы запись получалась четкая и достаточно компактная (см. рис. 152). Тумблером «диаграмма» включают движение бумажной ленты. Включают *TDA-3* за 15 мин до начала работы. В данной установке используют 3-канальный тензорный усилитель *TDA-3*, усиливающий сигналы одновременно от 3 объектов, что позволяет работать одновременно трем группам студентов.

Препаровка. Под стеклянный колпак кладут вату, смоченную эфиром, и помещают туда лягушку¹ на 7—10 мин. Затем лягушку прочно фиксируют на восковой пластинке с четырьмя отверстиями спинной стороной вверх. Через отверстия пластинки пропускают марлевые жгуты, укрепленные на конечностях лягушки, и попарно завязывают. Лягушку покрывают влажной салфеткой, чтобы избежать подсыхания кожи и связанных с этим движений животного.

Задачу выполняют на бульбарной лягушке. Для этого у лягушки вдоль головы большими ножницами разрезают кожу и обнажают черепную коробку. Затем, не ослабляя креплений передних конечностей, указательными пальцами левой руки подгибают голову лягушки книзу, при этом хорошо становится видна ромбовидная ямка. Скальпелем рассекают мышцы, покрывающие ромбовидную ямку. Еще больше наклонив голову лягушки, концами глазных ножниц надрезают кость выше переднего края ромбовидной ямки и удаляют часть черепной крышки. Граница между продолговатым мозгом и мозжечком хорошо видна. По этой границе рассекают мозг скальпелем. Голову животного закрепляют булавкой за верхнюю челюсть. Опыт начинают через 15—20 мин на одном из нижних лимфатических сердец. Его можно обнаружить по кожной пульсации в 3 мм справа и слева от нижнего конца уростиля.

¹ Для опытов берут лягушек, предварительно выдержанных 3—4 дня в холодильнике.

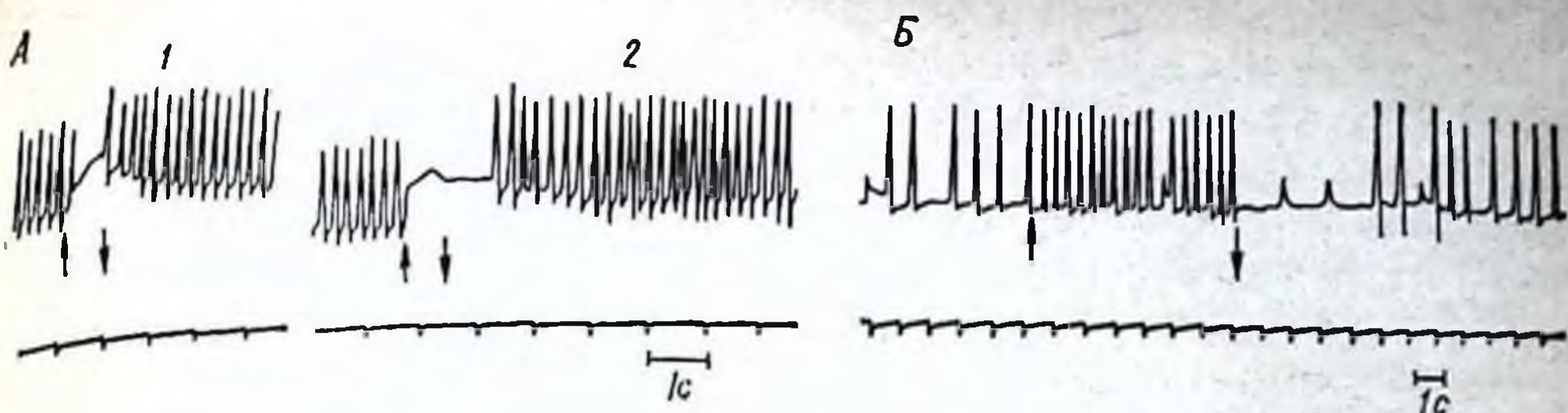


Рис. 150. Примеры кимографической записи. А — зависимость тормозной рефлекторной реакции лимфатического сердца при адекватном воздействии на желудок разными объемами вводимой жидкости; Б — стимуляторная реакция лимфатического сердца при электрическом раздражении желудка:
1 — 0,5 мл, 2 — 0,9 мл; стрелками показаны начало и конец раздражения

Пинцетом приподнимают кожу и осторожно образуют «окошко», в котором видно овальное, при сокращении похожее на пузырек (2—3 мм в диаметре), лимфатическое сердце. Оно заключено в соединительнотканную пленку. К этой пленке осторожно прикрепляют маленький серфин, нить от которого идет к датчику. Датчик закреплен на штативе в 10—15 см от пластинки с лягушкой (рис. 149, А).

При регистрации сокращений лимфатического сердца на кимографе нить от серфина соединяют с легким писчиком Энгельмана. Пример кимографической записи приведен на рис. 150: амплитуда импульсов 3 В, частота 1 Гц.

В течение дальнейшей работы следят за влажностью покровов тела лягушки и смачивают работающее лимфатическое сердце раствором Рингера.

Настройка и включение усилителя. До присоединения нитки серфина к тензодатчику, подключенному к одному из каналов усилителя, изучив инструкцию к прибору, настраивают усилитель. Порядок настройки: 1) включают тумблер питания — 12 В; 2) тумблер «осциллограф» переводят в положение «0»; 3) ручками R^1 , R^2 , RC добиваются нулевого положения индикатора. Присоединяют очень осторожно, маленьким кусочком пластилина нить от серфина к тензодатчику. Датчик должен оставаться в горизонтальном положении, а нить натянута.

Подбирают амплитуду колебаний лимфатического сердца необходимой величины (1,5—2 см), делая ряд переключений тумблером $\Delta R/R$. Задачу выполняют с применением двух методов раздражения.

Опыт 1А. Зависимость тормозной рефлекторной реакции от интенсивности адекватного раздражения

Ход работы. Ввести в желудок через глотку резиновый баллончик, насаженный на шприц с катетером (шприц на 1—2 мл), и фиксировать это приспособление достаточно жестко (можно с помощью

пластилина) на восковой пластинке рядом с лягушкой. Наладить регистрацию сокращений лимфатического сердца на самописце.

2. После установления четкого по ритму и амплитуде фона работы сердца (норма) не прекращая записи, последовательно, с интервалом 3—5 мин шприцем вводить порции по 0,3, 0,5, 0,7 и т. д. до 2 мл физиологического раствора. При каждом введении жидкости баллончик держать раздутым не более 7—10 с, затем жидкость откачивать. В конце опыта провести длительное (15—20 с) растягивание желудка, вводя 1—1,5 мл жидкости. Моменты введения и отсасывания жидкости отмечать на ленте самописца стрелками. Обязательно регистрировать восстановление нормального ритма сокращений после каждого введения.

3. При выполнении опыта определить пороговую величину адекватного раздражения, обратить внимание на изменения ритма и амплитуды сердечных сокращений при пороговых воздействиях (до наступления полной остановки сердца), отметить наличие или отсутствие эффектов последствия, в частности учащения ритма сердцебиений после рефлекторного их урежения; проследить, наступает ли эффект «ускользания» при длительном растяжении желудка. Весь ход опыта записывать в протокол.

Опыт 1Б. Зависимость тормозной рефлекторной реакции от параметров электрического раздражения желудка

Ход работы. 1. Разрезать с левой стороны тела кожу и мышцы и осторожно обнажить желудок. Вытягивать желудок не следует, так как при этом можно повредить нервные стволы, идущие по брыжейке, в составе которых проходят афферентные волокна исследуемых рефлексов. Проводить электрическое раздражение с помощью биполярных металлических электродов, представляющих собой две нихромовые проволоки, на одном конце загнутые г-образно вверх и вклеенные в плексигласовый блок. К противоположным концам проволоки припаяны проводники, которые с помощью клемм закрепить на стимуляторе. Подвести электроды под желудок так, чтобы его стенка касалась обоих электродов (желудок практически «лежит» на них). Следить, чтобы между электродами не было ни капли жидкости (шунт!).

2. Включить ленту самописца. Произвести запись сердечных сокращений в норме. На четком по ритму и амплитуде фоне, не прекращая записи, начать электрические раздражения желудка. Примерные параметры раздражающих стимулов: амплитуда стимулов 2—6 В, частота их следования 5—10 Гц, длительность стимула 1 мс, длительность раздражения 15—30 с. Раздражение подавать с интервалом 3—5 мин. Найти пороговые величины электрического раздражения, при которых впервые наблюдается торможение частоты сердечных сокращений. Отметить, сопровождаются ли изменения в ритме сердечных сокращений изменениями их амплитуды.

3. Постепенно увеличивать интенсивность раздражающих стимулов (при одной и той же частоте их следования и длительности действия раздражения) до получения полной остановки сердечных сокращений (полное торможение лимфатического центра).

4. Увеличивать амплитуду раздражающих стимулов на 1, 2, 3, 5 В и регистрировать зависимость длительности тормозной реакции от интенсивности раздражающих стимулов. Длительность раздражения во всех случаях должна быть одинаковой (15—30 с).

5. Обратить внимание на характер восстановления сердечных сокращений после снятия каждого раздражения. Отметить наличие или отсутствие эффектов рефлекторного последействия: эффекта «отдачи» — учащения сердцебиений, наступающего сразу же после прекращения раздражения, или постстимуляционного

торможения. Отметить отсутствие рефлекторных стимуляторных влияний с механорецепторов желудка на работу лимфатического сердца у бульбарной лягушки (рис. 151). Весь ход опыта записать в протокол.

Обработка результатов¹. Измеряют амплитуду и частоту сердечных сокращений в норме и в период их рефлекторного урежения при адекватном и электрическом раздражении желудка. Изображают графически зависимость длительности рефлекторного торможения от параметров адекватного и электрического торможения от параметров адекватного и электрического раздражения желудка. Продумывают механизмы рефлекторного торможения сердечных сокращений. Объясняют эффекты, наблюдаемые в последствии и эффекты «ускользания» исходя из того, что лимфатический центр принадлежит к числу нервных центров спинного мозга.

Опыт 2. Регистрация рефлекторной стимуляции деятельности лимфатических сердец лягушки

Методика. Опыт выполняют на спинальной лягушке: у фиксированной бульбарной лягушки, на которой проводили предыдущий опыт, удаляют крышу первого позвонка и скальпелем или глазными ножницами делают перерезку между продолговатым и спинным



Рис. 151. Тормозная рефлекторная реакция лимфатического сердца при электрическом раздражении желудка (параметры раздражения: амплитуда импульсов 2,5 В, частота 2 Гц, длительность импульсов 0,5 мс; стрелками отмечены начало и конец раздражения)

¹ При анализе данных этой и последующих задач следует помнить о том, что ритм сокращений лимфатических сердец отражает работу ритмоводителя лимфатического центра, а амплитуда сердечных сокращений — активность и число мотонейронов лимфатического центра (см. рис. 148).

мозгом. Начинают работу через 15—20 мин после восстановления спинальных рефлексов. Опыт выполняют с применением двух методов раздражения.

Опыт 2А. Зависимость стимуляторной рефлекторной реакции от интенсивности адекватного раздражения

Ход работы. 1. Наладить регистрацию сокращений лимфатического сердца на ленте самописца. Ввести через глотку резиновый баллончик, использованный в опыте 1. Весь ход работы и регистрацию результатов провести по схеме, указанной в опыте 1 А.

2. Обратить внимание на параметры, вызывающие пороговые изменения ритма, отметить величину амплитуды сердечных сокращений и эффекты, наблюдаемые в последствии (после снятия раздражения).

Опыт 2Б. Зависимость стимуляторной рефлекторной реакции от параметров электрического раздражения

1. Наладить регистрацию сокращений лимфатического сердца на ленте самописца. Зарегистрировать механограмму лимфатического сердца в норме. После установления четкого, однородного по ритму и амплитуде фона сокращений лимфатических сердец, не прекращая записи, начать электрическое раздражение желудка. Моменты начала и конца раздражений отмечать стрелками, параметры раздражения записывать на ленте самописца и в протокол. Определить пороговые параметры раздражающего тока, при которых впервые появляется эффект увеличения ритма сокращений лимфатического сердца (примерные пороговые величины раздражающего тока — амплитуда импульсов 3—8 В, частота 10 Гц, длительность импульса 1 мс, длительность раздражения 15—30 с).

2. Дробно увеличивая амплитуду импульсов на 1, 2, 3 В (частота сохраняется постоянной), регистрировать эффект стимулирующих рефлекторных влияний.

Обработка результатов. Обращают внимание на изменения ритма и величину амплитуды сердечных сокращений в период развития стимуляторных воздействий (рис. 152). Отмечают характер рефлекторного последствия.

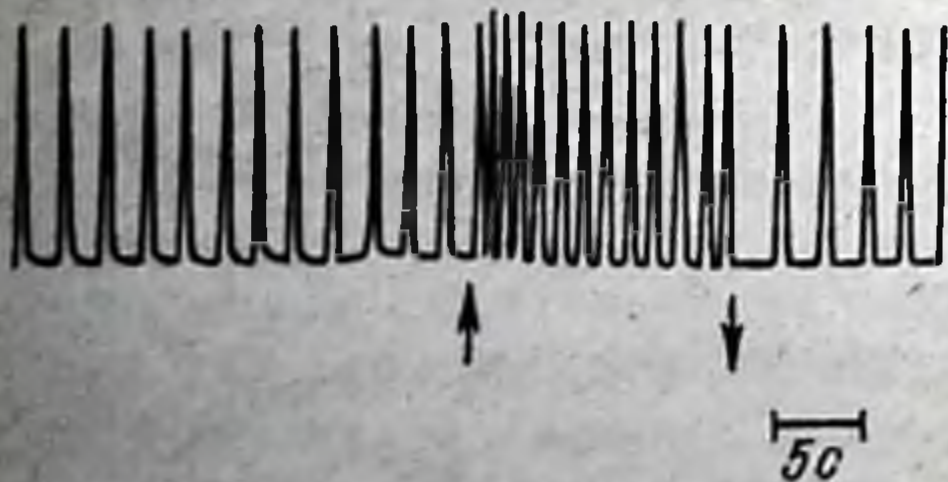


Рис. 152. Пример регистрации стимуляторной рефлекторной реакции лимфатических сердец на спинальном препарате (стрелками отмечены начало и конец раздражения)

Сопоставляют данные, полученные в опытах 1 и 2. Делают заключение о механизмах стимуляторных и тормозных рефлекторных влияний на деятельность лимфатических сердец с учетом данных о структурно-функциональной организации центра (см. (рис. 148, А, Б). Продумывают

возможные механизмы взаимодействия стимуляторных и тормозных рефлекторных воздействий на спинальный центр лимфатических сердец лягушки у бульбарных лягушек и объясняют отсутствие стимуляторных рефлексов с желудка у бульбарных лягушек. Делают общее заключение о механизме рефлекторной регуляции деятельности лимфатических сердец с учетом того, что тормозные и стимуляторные рефлекторные влияния изменяют только ритм сокращений лимфатических сердец и не изменяют амплитуды сердечных сокращений. Сопоставляют полученные данные с результатами изучения механизмов нервной регуляции кровяного сердца. Высказывают свои соображения о сходстве и различиях в механизме регуляции нейрогенной и миогенной автоматии лимфатического и кровяного сердец.

Задача 2. Усвоение лимфатическим центром лягушки ритма внешних искусственных раздражений

При изучении механизмов рефлекторной регуляции спонтанной ритмической активности лимфатического центра получены данные о возможности рефлекторного управления ритмом его работы. Так, при раздражении желудка электрическими стимулами, следующими с частотой 1 Гц, лимфатический центр может усваивать ритм внешних раздражений. Это выражается в том, что ритм его работы, а следовательно, и ритм сердечных сокращений точно соответствует ритму поступающих раздражений. Такое поведение нервного центра отражает известное в физиологии явление «усвоение ритма». После снятия искусственного раздражения часто наступает пауза — постстимуляционное торможение лимфатического центра, выражающееся при регистрации сокращений лимфатических сердец в торможении, остановке сердца. По окончании паузы лимфатические сердца сразу же начинают сокращаться в исходном спонтанном ритме. Иногда пауза после прекращения раздражения может отсутствовать, в этом случае после снятия раздражения сразу же восстанавливается тот ритм сердечных сокращений, который был до начала раздражения (рис. 153).

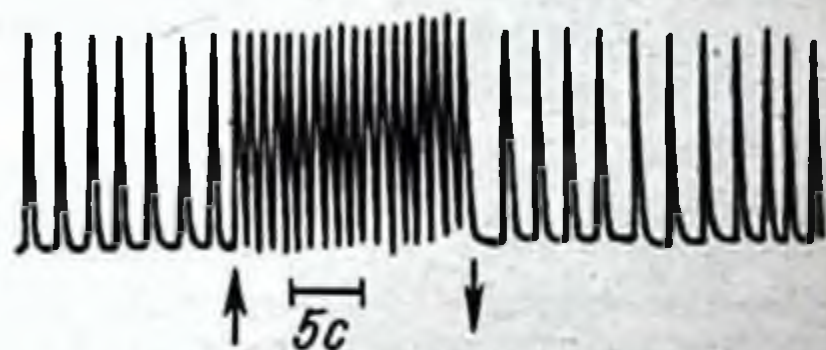


Рис. 153. Феномен «навязывания ритма» (стрелками отмечены начало и конец раздражения)

Методика. Задачу выполняют на той же спинальной лягушке, на которой проводили опыт 2.

Ход работы. 1. Включить установку (см. задачу 1, опыт 1 А). Зарегистрировать на ленте самописца механограмму сердечных сокращений в норме.

2. Не прекращая записи, произвести раздражение желудка электрическими стимулами с частотой 1 Гц. Примерные параметры раздражения: интенсивность 1,5—5 В, длительность — 1 мс. Провести 4 записи механограммы, изменяя длительность раздражения от 15 с до 1 мин с интервалом 15 с. Зарегистрировать после каждого раздражения (отмечая начало его и конец стрелками) сердечные сокращения до полного восстановления нормы. Если после снятия раздражения наступает пауза, зарегистрировать ее, дождаться вос-

становления нормальных сердечных сокращений и зарегистрировать их.

3. При отсутствии паузы увеличить на 1, 2, 3 В интенсивность раздражающих стимулов и повторить опыт.

Обработка результатов. Измеряют частоту и амплитуду сердечных сокращений в норме и в период «усвоения ритма». Обращают внимание на то, сразу ли после включения раздражения устанавливается «навязанный» ритм. Отмечают наличие или отсутствие паузы после прекращения раздражения; при наличии паузы прослеживают зависимость длительности паузы от длительности раздражения. Объясняют феномен усвоения ритма с учетом структурно-функциональной организации спинального центра лимфатических сердец лягушки.

Задача 3. Трансформация ритма внешних раздражений в лимфатическом центре лягушки

При искусственном возбуждении лимфатического центра, вызванном электрическими раздражениями желудка (стимулами высокой частоты), лимфатический центр трансформирует ритм внешних раздражений. Биологический смысл трансформации ритма лимфатическим центром заключается в том, чтобы перевести частоту внешних раздражений в такой рабочий ритм, который могут воспроизвести лимфатические сердца.

Методика. См. опыт 2 задачи 1.

Ход работы. Зарегистрировать на самописце механограмму сердечных сокращений спинальной лягушки в норме. Не прекращая записи, произвести раздражение желудка электрическими стимулами, частоту которых варьировать в пределах 1, 2, 3, 4, 5 Гц (интенсивность стимулов и их длительность — см. опыт 2 задачи 1). Длительность каждого раздражения 30 с, по окончании раздражения зарегистрировать механограмму сердечных сокращений до полного восстановления ритма сердечных сокращений. Отметить наличие или отсутствие паузы после снятия раздражения.

Обработка результатов. Измеряют ритм и амплитуду сердечных сокращений в норме, в период раздражения и в период восстановления сердечных сокращений. Вычисляют коэффициент трансформации ритма внешних раздражений — отношение числа сердечных сокращений к числу раздражающих стимулов при разных частотах раздражения. Составляют таблицу (см. ниже пример записи опыта). На основании этих данных делают заключение о механизме трансформации ритма в лимфатическом центре.

Число сердечных сокращений в норме	Частота раздражающих стимулов, Гц	Время раздражения, с	Число раздражающих стимулов за 30 с	Число сердечных сокращений за 30 с	Коэффициент трансформации
40	5	30	150	45	0,3

Рекомендуемая литература: [32]; [33]; [34]; [35] — с. 554; [40] — с. 154—156; 281—284.

ФИЗИОЛОГИЯ ПИЩЕВАРЕНИЯ

Физиология пищеварения охватывает большой круг физиологических проблем, связанных с изучением процессов, обеспечивающих механическое и химическое (ферментативное) расщепление пищевых веществ на элементы, лишенные видовой специфичности и пригодные к ассимиляции. Современный этап развития физиологии пищеварения (гастроэнтерология) характеризуется исследованиями основных закономерностей строения и функционирования пищеварительного аппарата на всех уровнях его организации — молекулярном, клеточном, органном, организменном.

При изучении физиологии пищеварения используют два принципиальных подхода к изучению секреторно-двигательной функции пищеварительной системы. Первый, разработанный И. П. Павловым, — *оперативно-хирургический метод* — позволяет вести физиологические наблюдения в хроническом эксперименте на практически здоровом животном. Таким путем исследуют состав и свойства секретов различных пищеварительных желез, динамику секреторного процесса, двигательную функцию желудочно-кишечного тракта, механизмы нервно-гуморальной регуляции различных отделов пищеварительной трубки. Второй — *метод острых опытов* — позволяет изучать механизмы секреции отдельных пищеварительных желез при стимуляции нервов и действии фармакологических агентов, исследовать биоэлектрические явления в пищеварительном аппарате и отдельных клетках.

При изучении физиологии пищеварения на молекулярном и клеточном уровнях широко используют методы биохимии и цитологии. Сочетание различных цитологических, электронно-микроскопических, автордиографических и биохимических методов позволило детально исследовать процессы, протекающие в секреторных клетках в различные фазы секреторного цикла, выяснить роль различных компонентов клетки в образовании секрета и перемещении секреторного продукта в клетках пищеварительных желез.

Данный раздел большого практикума является продолжением практикума по оперативной хирургии и включает острые и хронические операции на желудочно-кишечном тракте теплокровных. На этих операциях студенты овладевают основными приемами работы, связанными с вскрытием брюшной полости и полостей желудочно-кишечного тракта, учатся «сшивать» разрезанные ткани, бороться с кровотечениями, детально знакомятся с особенностями иннервации и кровообращения желудочно-кишечного тракта. Все острые операции разработаны сотрудниками кафедры на кошках как на более удобном и доступном для практикума объекте и описаны в настоящем руководстве впервые. В условиях острого опыта на кошках студенты выполняют операцию малого желудка по методу Павлова и операцию на кишечнике по методу Тирри-Велла. Приобретенные навыки они используют при выполнении в стерильных условиях контрольной хронической операции на собаке. В предлагаемый раздел включены также две экспериментальные задачи, посвященные изучению механизмов регуляции слюноотделения и поджелудочного сокоотделения. При выполнении этих задач студенты приобретают навыки сложных препаровок, связанных с введением канюли в протоку слюнных и поджелудочной желез у кошки, препаровкой нервов и сосудов и др. Выполнение этих задач углубляет знания студентов о сущности секреторного процесса и его нервно-гуморальной регуляции.

ТЕМА I. РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

Ротовая полость — начальный отдел пищеварительного тракта. Пребывание пищи в этом отделе непродолжительно, но происходящие в нем процессы оказывают влияние на все этапы, связанные с поглощением, переработкой и всасыванием продуктов питания.

Различные качества пищи, воздействуя на богатый рецепторный аппарат ротовой полости — вкусовые, тактильные, температурные и болевые рецепторы, в значительной степени «задают программу» деятельности всего пищеварительного аппарата. Афферентные сигналы от рецепторов полости рта поступают в нервные структуры, расположенные на различных уровнях ЦНС и условно объединяемые под названием «пищевой центр». Возникающие под влиянием этой информации эфферентные команды «пищевого центра» вызывают возбуждение слюнных желез и играют существенную роль в процессах, подготавливающих переработку пищи в последующих отделах желудочно-кишечного тракта.

В процессах, происходящих в полости рта, важнейшую роль играет слюна, выделяемая в полость рта слюнными железами. Вкусовая рецепция осуществляется лишь при условии, что вещество находится в растворенном состоянии. Очень важна роль слюны для формирования пищевого комка и дальнейшего перехода и переработки пищи в желудке.

В ротовую полость впадают протоки трех пар больших желез: околоушной *gl. parotis*, подчелюстной *gl. submaxillaris*, подъязычной *gl. sublingualis* — и множество мелких желез. По строению и составу выделяемого секрета слюнные железы делят на три группы: *слизистые, серозные и смешанные*. Секреторные клетки слизистых желез выделяют мукопротеин — муцин, специфические свойства которого определяют вязкий характер слюны, воду и органические и неорганические вещества. К истинно слизистым слюнным железам относят мелкие железы ротовой полости. Околоушная железа — чисто серозная, ее клетки выделяют водянистую слюну, содержащую органические и неорганические вещества, и одно или несколько белковых веществ. Подчелюстная и подъязычная железы смешанные — они состоят как из слизистых, так и из серозных клеток.

Клетки слюнных желез объединяются в группы — *ацинусы*, между которыми проходят межклеточные секреторные каналы, открывающиеся в полость ацинуса. Продолжение этой полости составляют вставочные протоки, переходящие в междольковые и главный протоки. В ацинусах располагаются миоэпителиальные, корзинчатые клетки, обладающие сократительной функцией. При сокращении они «выдавливают» секрет, накопившийся в протоках.

При исследовании физиологии слюнных желез теплокровных используют острые и хронические методы. Основной прием в условиях острого опыта заключается в канюлировании протоков, что дает возможность исследовать количество и качество слюны при различных экспериментальных воздействиях. В частности, в таких опытах можно изучать динамику секреторного процесса в сочетании с исследованием механизмов нервной регуляции, так как эфферентные нервные стволы вегетативной нервной системы относительно легко доступны для экспериментирования.

К ацинарным клеткам слюнных желез подходят немиелинизированные нервные волокна парасимпатической и симпатической систем. Нейроны, от которых отходят преганглионарные парасимпатические волокна лицевого нерва *n. facialis*, снабжающие подчелюстные и подъязычные слюнные железы, лежат в верхнем слюноотделительном ядре продолговатого мозга. В составе барабанной струны *ch. tympani* преганглионарные волокна достигают подчелюстного и подъязычного ганглиев *g. submaxillare, g. sublinguae*, расположенных в теле каждой железы. Постганглионарные волокна оканчиваются на клетках указанных желез.

Нейроны, от которых отходят симпатические преганглионарные волокна, расположены в боковых рогах спинного мозга на уровне II—VI грудных сегментов. Эти волокна подходят к верхнему шейному ганглию *g. cervicale superius*, где заканчиваются на постганглионарных нейронах. Постганглионарные нервные волокна достигают подчелюстную и подъязычную слюнные железы.

Механизм секреции пищеварительных желез включает два процесса: перемещение воды и некоторых электролитов крови через секреторные клетки в просвет

железы и выброс секреторными клетками синтезированного в них коллоидного органического материала. Регуляция этих процессов осуществляется с участием парасимпатической и симпатической нервных систем.

Парасимпатическая нервная система играет главную роль в регуляции слюноотделения. Возбуждение эфферентного нерва парасимпатической системы *ch. Iypaпi* приводит к выделению большого количества слюны подчелюстной железой. «*Симпатическая секреция*» этой железы имеет ряд особенностей: количество выделяющейся слюны значительно меньше, чем при раздражении *ch. Iypaпi*, слюна содержит больше белковых веществ. Стимуляция шейного симпатического ствола вызывает также активацию сократительных элементов — миоэпителиальных, корзинчатых клеток слюнных желез, что приводит к увеличению общего секреторного эффекта за счет «выдавливания» слюны из протоков.

Цель работы. Освоить операцию введения канюли в проток подчелюстной железы. Зарегистрировать характер слюноотделения подчелюстной железы кошки при стимуляции парасимпатического и симпатического нервов и действии фармакологических агентов.

Задача. Нервная регуляция слюноотделения в условиях острого опыта на кошке

Методика. Операции и эксперименты на кошках и собаках осуществляют группы студентов по 3—4 человека. Перед началом работы распределяют обязанности на каждом этапе так, чтобы каждый студент имел возможность участвовать во всех основных моментах проведения операции и эксперимента.

Основные приборы и оборудование. Система для регистрации слюноотделения¹; кимограф; универсальный штатив; рычаг Энгельмана с легким писчиком; стимулятор типа ЭСЛ-2; металлические раздражающие погружные электроды (диаметр проволоки 0,3 мм, межэлектродное расстояние 2 мм); отметчик раздражения; отметчик времени; шприцы на 1 и 5 мл; трахеотомическая трубка; тонкий металлический зонд с оплавленным концом для слюнного протока (диаметр 0,3 мм); полиэтиленовая канюля для протока; набор хирургических инструментов; большие изогнутые ножницы для стрижки шерсти 1, ножницы средние прямые 1, ножницы глазные с острыми концами 1, скальпель брюшистый 1, зажим Пеана 4, пинцеты анатомические 2, пинцеты глазные 2, зажим Диффенбаха 2, крючки стеклянные, крючки металлические; шелк тонкий для лигатур; марлевые салфетки; ватные тампоны; простыня для кошки; раствор Рингера для теплокровных; спирт; иод; 5%-ный раствор аммиака (для отмывания рук от крови).

Принцип регистрации слюноотделения основан на жидкостной передаче слюны, выделяющейся из протока исследуемой железы.

Основными элементами регистрационной системы (рис. 154) являются: цилиндр с поплавком и полиэтиленовая трубка с внутренним диаметром 3—4 мм. Цилиндр длиной 6 см сделан из широкой стеклянной трубки — внутренний диаметр 7—9 мм. Трубка закрыта с одного конца пробкой, которая служит дном

¹ Разработана сотрудником кафедры В. С. Зиксом.

цилиндра. Цилиндр сообщается с толстостенной трубкой при помощи изогнутой стеклянной трубочки-переходника, выходящей из цилиндра через отверстие в пробке. В цилиндр вложен поплавок, сделанный из хорошо обточенной пробки, диаметром несколько меньше диаметра цилиндра, так как он должен свободно проходить внутри цилиндра, не касаясь стенок. Для этой цели по бокам поплавка, примерно посередине, вколоты шпильки. Поплавок может быть выполнен и из плотной резиновой трубки, в которую вводится сердечник; это позволяет избегать набухания поплавка при постоянном нахождении его в растворе. В поплавок строго по центру вколота стальная негнущаяся проволока с развилкой наверху. Цилиндр закрепляют на универсальном штативе в вертикальном положении. На этом же штативе над цилиндром помещают рычаг Энгельмана так, чтобы длинное плечо писчика приходилось на развилку. В систему вводится градуированная бюретка с краном для калибровки цилиндра. Она закреплена на другом штативе, соединяется с той же полиэтиленовой трубкой при помощи тройника.

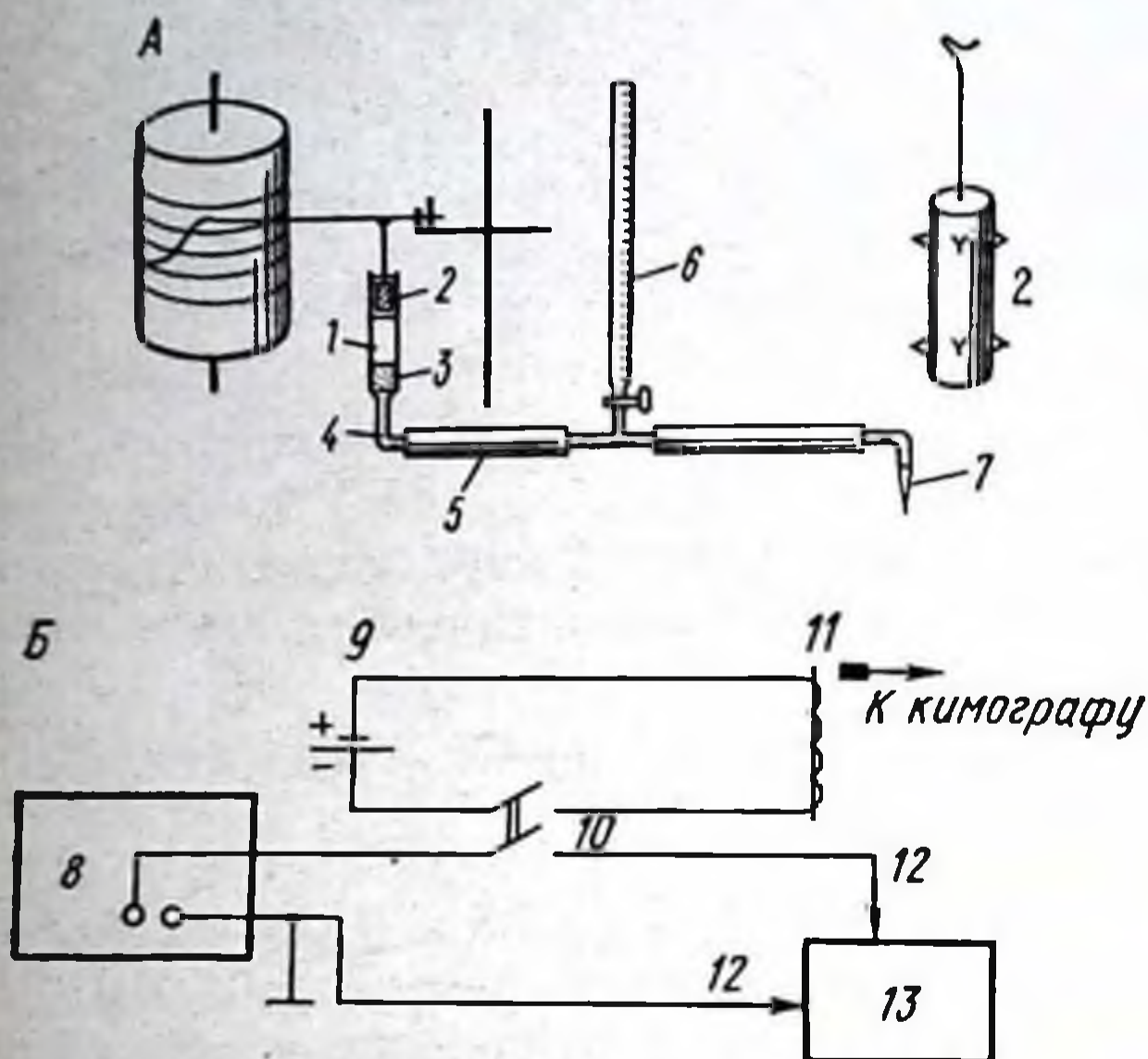


Рис. 154. Установка для регистрации слюноотделения (А) и схема раздражения (Б):

1 — цилиндр с поплавком (2), 3 — пробка с отверстием, служащая дном цилиндра, 4 — трубка-переходник, 5 — толстостенная резиновая трубка, 6 — бюретка с краном, 7 — капюля, 8 — стимулятор, 9 — аккумулятор, 10 — ключ, 11 — отметчик, 12 — электрод, 13 — объект

Для подготовки регистрационной системы к работе ее заполняют водой через воронку, вставленную в конец трубки. Вода должна заполнить систему без пузырьков. При заполнении цилиндра водой поплавок начнет подниматься вместе с уровнем воды, если цилиндр закреплен строго вертикально. После заполнения системы водой трубку пережимают зажимом. Откалибровывают цилиндр. При поднятии или опускании бюретки вращением вертикального винта на штативе, где она закреплена, при открытом кране поднимается или опускается уровень воды в цилиндре соответственно определенным изменениям объема жидкости в бюретке. Поднимают бюретку на такую высоту, чтобы уровень жидкости изменился на 0,05 мл, закрывают кран. На такой же объем изменится уровень жидкости в цилиндре. Отмечают этот уровень на стенке цилиндра стеклографом, и так через каждые 0,05 мл. Таким образом цилиндр будет откалиброван. После окончания калибровки кран бюретки закрывают.

Вместе с изменением уровня жидкости в цилиндре изменяется положение поплавка и положение писчика. Каждый раз записывают новое положение писчика на кимографе, соответствующее определенному изменению объема жидкости в цилиндре. Таким обра-

зом, разлиновывают кимографную бумагу так, что расстояние между соседними линиями будет соответствовать выделению из протока в систему 0,05 или 0,1 мл. Если вести регистрацию слюноотделения на такой линованной бумаге, можно сразу определить количество слюны, выделившейся при различных воздействиях¹.

Для введения в слюнный проток применяют тонкую канюлю с длинным кончиком (6—7 мм), сделанную из полиэтиленовой трубки. Для этого трубку диаметром 0,5 см нагревают, равномерно ее вращая, над пламенем газовой горелки, в горячем воздухе (не в пламени!). Когда трубка заметно размягчится, ее осторожно растягивают (не рывком) и делают ножницами на конце косой срез. Приблизительная длина канюли 5 см, длина кончика 6—7 мм. Диаметр кончика канюли не должен быть слишком узким, так как слюна — вязкий секрет, и она может закупорить просвет канюли. Оптимальным является диаметр кончика, близкий к диаметру просвета слюнного протока.

Собирают схему для раздражения нервов с подключением отметчика раздражения: присоединяют электроды к стимулятору через ключ, к клеммам которого подсоединены провода от отметчика раздражения, при замыкании ключа момент раздражения нервов фиксируется на бумаге (см. рис. 154, Б).

Подготовка животного к опыту. Опыты проводят на голодных животных, не кормленных в течение суток до операции. Сытые кошки плохо переносят наркоз и оперативные вмешательства. Для опытов берут среднеупитанных животных массой 3 кг.

1. Вводят кошке внутрибрюшинно нембутал (40 мг/кг) или гексенал (150 мг/кг). Введение наркоза кошке требует большого внимания и осторожности. В этой процедуре принимают участие два человека: один держит кошку правой рукой за кожу в области затылка и шеи, а левой — задние конечности и укладывает кошку на бок на стол. Второй — вводит иглу шприца в область брюха. Важно, чтобы игла вошла не под кожу, а внутрибрюшинно. Наркоз в этом случае наступает очень быстро и через 7—10 мин кошка засыпает. Если же игла попадает лишь под кожу, кошка долго не засыпает, иногда требуется повторное введение наркоза, что нежелательно, так как такое животное делается агрессивным, а кроме того, дополнительное введение наркоза может привести к летальному исходу.

2. Спящее животное переносят на операционный стол, укладывают на спину и фиксируют голову в специальном зажиме с кольцом, помещаемым под зубы верхней челюсти. Голова должна распола-

¹ Регистрацию слюноотделения ведут длительное время, и при этом требуется не одна бумажная лента. Для упрощения калибровки бумажной ленты кимографа заранее разлиновывают бумагу, зная, что определенное расстояние между параллельными линиями соответствует определенному объему. Для этого нужно прочертить нулевую линию писчиком при быстром вращении барабана кимографа, от нее отложить нужное расстояние и снова прочертить писчиком следующую линию и т. д. (например, если 0,05 мл соответствует 1 см, то прочерчивают писчиком линии через каждый 1 см).

гаться несколько ниже по отношению к туловищу, что делают с помощью подвижного зажима, укрепленного на вертикальном стержне операционного стола. Под шею кошки подкладывают подушку, обшитую клеенкой. На передние конечности, вытянутые вдоль туловища, выше локтевых суставов надевают лямки, крепко затягивают их и переводят за спиной на противоположную сторону туловища, где правая лямка ложится на предплечье левой лапы, а левая — на предплечье правой. Концы лямок закрепляют на крючках операционного стола (фиксация «крест на крест»). Задние конечности также фиксируют при помощи лямок, обхватывающих нижнюю часть голени и закрепляемых на своей стороне. При такой фиксации тело животного не перекашивается, мышцы живота и внутренние органы не смещаются, что способствует правильному рассечению тканей.

Начинают операцию только на животном, находящимся под глубоким наркозом! Глубину наркоза проверяют по отсутствию зрачкового рефлекса и низкому тону брюшных мышц. Весь период операции следят за глубиной наркоза. При первых признаках пробуждения (движения животного, стоны, моргания) вводят дополнительно 40—60 мг нембутала. После фиксации животного, убедившись, что кошка находится под глубоким наркозом, накрывают ее простыней и приступают к операции.

3. Проводят операцию трахеотомии. Это необходимо потому, что при выполнении задачи на слюнной железе выделяется большое количество слюны и бронхиальной слизи, что может серьезно нарушить дыхание. Слизь можно удалить через трахеотомическую трубку. Кроме того, при значительном нарушении дыхания кошку можно быстро перевести на искусственное дыхание, подключив к трахеотомической трубке аппарат искусственного дыхания.

*Препаровка протока подчелюстной железы,
барабанной струны, симпатического нерва на шее
(все на одной стороне), бедренной вены*

*Препаровка протока подчелюстной железы (рис. 155). 1. Срезают ножницами шерсть на нижней челюсти и шее. Разрезают скальпелем кожу вдоль нижней челюсти по средней линии, отступя от подбородка на 1,5 см, и заканчивают разрез на уровне угла нижней челюсти. Отсепаровывают кожу тупой стороной скальпеля. Под кожей лежит тонкая подкожная мышца *m. platysma myoideus*, покрывающая всю нижнюю челюсть; рассекают ее по средней линии (у кошек эта мышца тонкая и часто рассекается вместе с кожей). Берут на зажимы Пеана кожу вместе с подкожной мышцей. Открывается второй слой мышц, ротовая диафрагма — подъязычно-челюстная мышца *m. mylohyoideus* и двубрюшная мышца *m. digastricus*.*

2. Разрезают скальпелем подъязычно-челюстную мышцу, отступя от средней линии на 0,5 см и ведя разрез вдоль челюсти. Слюнные протоки располагаются под этой мышцей. Ориентиром для на-

хождения протоков слюнных желез является языкоглоточный нерв *p. glossopharyngeus*, идущий по длине разреза и попадающий в поле зрения после вскрытия подъязычно-челюстной мышцы. В верхней части вскрытой области хорошо заметен язычный нерв *p. lingualis*, пересекающий протоки подчелюстной и подъязычной слюнных желез. От язычного нерва каудально, в сторону железы отходит нервная веточка — барабанная струна. Языкоглоточный нерв, язычный нерв и барабанная струна образуют подчелюстной треугольник, в центре которого проходят слюнные протоки, тесно прилегающие одни к другому и имеющие вид белесых ниточек. Медиальный из них — проток подчелюстной железы, латеральный — подъязычной.

3. Отпрепаровывают протоки от окружающих тканей как можно rost-ральнее за язычным нервом, пользуясь металлическими и стеклянными крючками. Берут их на лигатуру и перевязывают. После наложения лигатуры протоки набухают от прибывающей слюны и становятся более заметными. Отделяют протоки один от другого и тщательно отсепааровывают от пленок.

4. Подводят лигатуру под медиальный проток, немного ниже 1-й лигатуры, и делают острыми ножницами четкий надрез на протоке по направлению к железе. В надрез вводят зонд: если надрез сделан на протоке, зонд легко пройдет по всей его длине. Убедившись, что зонд в протоке, вынимают его и тотчас вводят канюлю. (Удобно ввести канюлю в проток следующим образом: зонд про- деть в канюлю, как нитку в игольное ушко, и таким зондом войти в проток; затем, осторожно вынимая зонд из протока, одновременно вводить канюлю в проток). Кончик канюли должен быть заполнен физиологическим раствором, подкрашенным метиленовым синим или другим красителем. При выделении слюны окрашенный стол- бик жидкости начнет смещаться, это будет свидетельствовать о том, что канюля находится в протоке.

5. Канюлю завязывают ранее подведенной лигатурой и надежно закрепляют. Для этой цели прошивают кожу на подбородке тол-стой иглой с ниткой и ею обвязывают канюлю. Таким образом, ка- нюля будет жестко зафиксирована на подбородке. Следят за тем, чтобы канюля не перекручивала проток, а являлась его продол- жением.

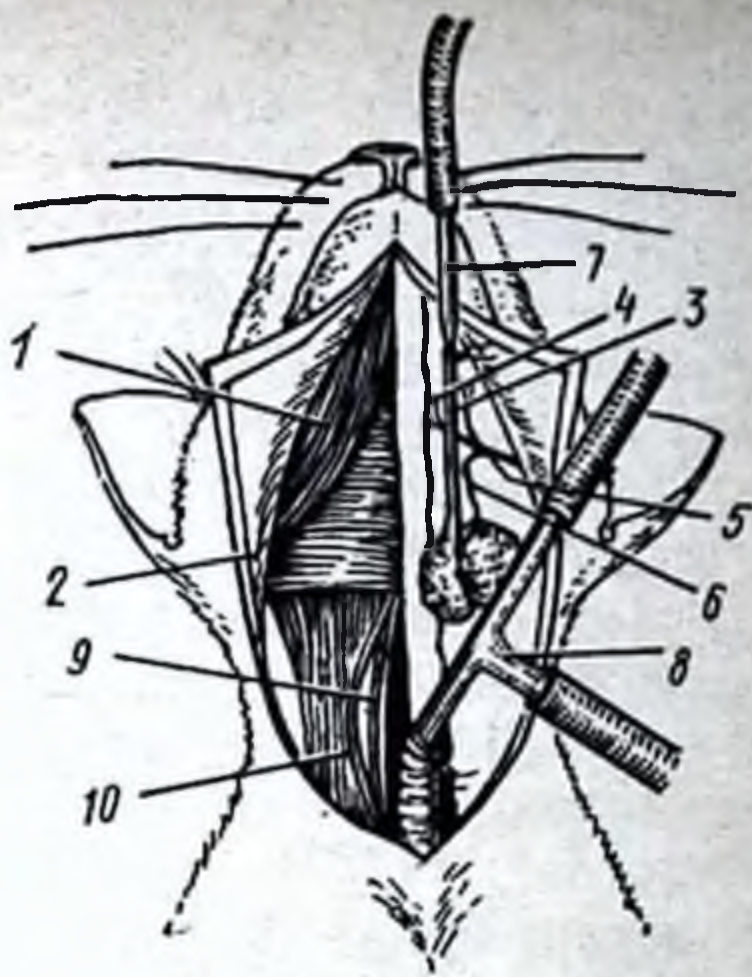


Рис. 155. Топография мышц нижней челюсти, нервных стволов и слюнных протоков кошки:

1 — двубрюшная мышца *m. digastricus*, 2 — ротовая диафрагма *m. mylohyoideus*, 3 — протоки подчелюстной и подъязычной желез, 4 — языкоглоточный нерв *p. glossopharyngeus*, 5 — язычный нерв *p. lingualis*, 6 — барабанная струна *chorda tympani*, 7 — канюля, 8 — трахеотомическая трубка, 9 — симпатический нерв *p. sympathicus*, 10 — блуждающий нерв *p. vagus*

Препаровка барабанной струны. Секреторный парасимпатический нерв — барабанная струна отходит от язычного нерва под прямым углом между слюнными протоками и краем нижней челюсти. Со своей верхней ветвью и язычным нервом он образует фигуру, напоминающую якорь (рис. 155, 6). Отпрепаровывают нерв стеклянными крючками, берут на лигатуру (нерв не натягивают, периодически смачивают физиологическим раствором, вне периодов раздражения снимают с электродов).

Препаровка симпатического нерва. С двух сторон от трахеи отыскивают сосудисто-нервные пучки, располагающиеся латеральнее и несколько глубже трахеи. В каждый пучок входит толстый, блуждающий нерв и тонкий — симпатический. Выделяют симпатический нерв той же стороны, на которой отпрепарованы проток подчелюстной железы и барабанная струна и берут его на лигатуру (описание препаровки симпатического нерва см. в теме X, рис. 145).

Препаровка бедренной вены. Ножницами срезают шерсть на внутренней поверхности бедра (см. рис. 146). Через кожу хорошо видны сосуды. Рассекают кожу скальпелем по ходу сосудов, отсепаровывают бедренную вену и берут на лигатуру. Для многократного введения исследуемых веществ используют канюлю, вставленную в вену. Для этого подводят под вену еще одну лигатуру, центральный участок до места будущего разреза пережимают зажимом Диффенбаха, периферический участок поддерживают лигатурой. Между зажимом Диффенбаха и лигатурой делают разрез острыми ножницами и вводят канюлю, прочно закрепляя ее лигатурой, подведенной под вену (канюля с коротким носиком и хорошо выраженной шейкой; на ее широкий конец насажена резиновая трубка, плотно перевязанная ниткой; в эту трубку по ходу опыта вводят исследуемые вещества).

Слюнные протоки, отпрепарованные нервные стволы, сосуды, обнаженные ткани закрывают марлевыми салфетками и тампонами, смоченными теплым физиологическим раствором, которые обновляют в течение опыта, чтобы обнаженные ткани не пересыхали и не охлаждались.

Опыт 1. Раздражение парасимпатического нерва (барабанной струны)

Ход работы. 1. Привести регистрационную систему в рабочее состояние: канюлю, вставленную в проток подчелюстной железы, заполнить физиологическим раствором и соединить с трубкой регистрационной системы, до краев заполненной водой. Для этого надеть на канюлю мягкую короткую резиновую трубку, а в просвет регистрационной трубки (см. рис. 154) вставить стеклянную трубку. Обе трубки должны быть подобраны заранее и подогнаны по диаметру — тогда они легко войдут одна в другую. При соединении канюли с регистрационной системой следить, чтобы воздух не попал в систему, пузырьки воздуха снижают чувствительность системы (проверка чувствительности: легкое сжатие пальцами резиновой трубки вызывает резкий подъем писчика вверх).

Регистрационная трубка довольно тяжелая, поэтому ее нужно жестко зафиксировать на вертикальном стержне операционного стола (прикрепить при помощи муфты к стержню или специальному штативу), в противном случае после присоединения к канюле она может выдернуть канюлю из протока.

2. Наладить регистрацию слюноотделения. Подвести писчик к кимографу. Установить среднюю скорость движения барабана. Установить концы писчиков от отметчика раздражения и отметчика времени так, чтобы они совпадали по вертикали с концом писчика рычага Энгельмана, регистрирующего отделение слюны. Запись на кимографе лучше начинать с нижней части барабана, так как писчик при слюноотделении всегда поднимается. По окончании каждой записи возвращать писчик в исходное положение отсасыванием жидкости из цилиндра при помощи шприца.

3. Начинать опыт с записи кривой спонтанного слюноотделения. Обычно длительность такого слюноотделения невелика и количество слюны мало. По окончании записи отметить в протоколе количество спонтанно выделившейся слюны, вернуть писчик в исходное положение и приступить к раздражению барабанной струны.

4. Соединить биполярные металлические погружные электроды со стимулятором и подвести под барабанную струну (нерв должен быть влажным, касаться обоих электродов; он не должен подсыхать; при увлажнении необходимо убирать лишнюю жидкость во избежание шунтирования электродов). Установить на стимуляторе частоту раздражающих стимулов 10 имп/с, длительность стимула 0,5 мс. Начать раздражение с напряжения 0,5 В и, постепенно увеличивая напряжение, найти пороговую величину раздражающего тока, при которой сразу же после включения раздражения возникает эффект слюноотделения. Если при увеличении напряжения тока до 2 В слюноотделение не наступит, увеличить длительность стимула до 1 мс, а частоту до 15—20 имп/с.

В течение всего опыта использовать одну и ту же длительность раздражения 15—20 с. Интервалы между раздражениями должны быть не менее 3 мин.

5. При пороговой частоте и длительности раздражающих стимулов градуально, на 1 В, увеличивать напряжение раздражающего тока до максимальной величины. Каждый раз записывать эффект на кимографе и отмечать в протоколе.

6. Используя максимальное напряжение раздражающего тока, изменять частоту раздражающих стимулов от 5 до 30 имп/с (5, 10, 20, 30 имп/с) при длительности стимула 0,5 мс. Каждое раздражение давать в течение 15 с. Сделать 4 записи на кимографе. Отметить в протоколе основные показатели эффекта слюноотделения.

Обработка результатов. Протокол удобно вести по прилагаемому образцу (табл. 1 и табл. 2). Представляют графическую зависимость эффекта слюноотделения от напряжения и частоты раздражающего тока. Примеры кимографической записи эффекта слюноотделения подчелюстной железы при раздражении парасимпатического нерва даны на рис. 156.

Таблица 1. Раздражение барабанной струны.
Зависимость эффекта слюноотделения от интенсивности раздражающих стимулов (длительность стимула 0,5 мс, частота 10 Гц, длительность раздражения 15 с)

Время	Напряжение раздражающих стимулов	Латентный период	Крутизна нарастания слюноотделения	Длительность периода слюноотделения	Количество слюны	Эффект последействия	Примечание

Таблица 2. Раздражение барабанной струны.
Зависимость эффекта слюноотделения от частоты раздражающих стимулов (длительность стимула 0,5 мс, напряжение постоянное 5 В, длительность раздражения 15 с)

Время	Частота раздражающих стимулов	Латентный период	Крутизна нарастания слюноотделения	Длительность периода слюноотделения	Количество слюны	Эффект последействия	Примечание

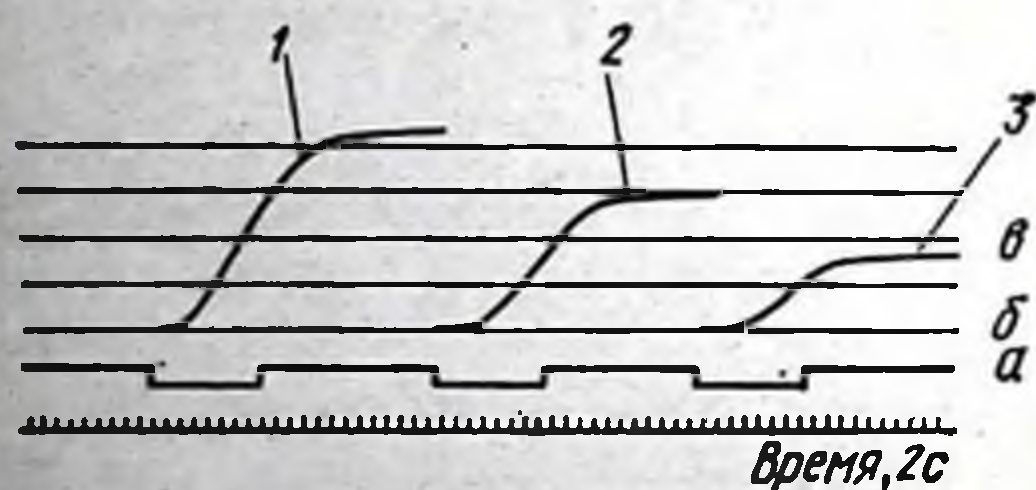


Рис. 156. Кривые слюноотделения при раздражении электрическим током барабанной струны (1, 2) и симпатического нерва (3):
1, 2 — раздражения 3 и 2 В, частота 10 имп/с, 3 — 4 В, 20 имп/с; а — отметка раздражения, б, в — калибровочные линии

Объясняют полученные результаты с учетом того, что в опыте раздражаются преганглионарные волокна парасимпатической нервной системы.

Опыт 2. Раздражение симпатического нерва

Ход работы. 1. Через 15—20 мин после окончания опыта с раздражением парасимпатического нерва подвести электроды под шейный симпатический нерв, соблюдая условия предыдущего опыта (см. опыт 1, пункт 4).

2. Установить на стимуляторе частоту раздражающих стимулов 15—20 имп/с, длительность стимула 1 мс (параметры раздражения для симпатического нерва обычно больше, чем для парасимпатического), длительность раздражения 20 с.

3. Провести опыт с раздражением симпатического нерва по схеме, используемой при раздражении барабанной струны (см. опыт 1, пункты 4—6). Записать на кимографе эффекты слюноотделения при изменении напряжения и частоты раздражающего тока.

Обработка результатов. При составлении протокола используют табл. 1 и 2. Представляют графики зависимости эффекта слюноотделения от частоты импульсов и напряжения раздражающего тока. Сравнивают данные, полученные при раздражении парасимпатического и симпатического нервов. Делают заключение о действии двух отделов вегетативной нервной системы на слюноотделение кошки в условиях острого опыта. Примеры кимографической записи эффекта слюноотделения при раздражении симпатического нерва даны на рис. 156.

Опыт 3. Раздражение симпатического нерва после раздражения барабанной струны

Этот эффект известен в литературе как «явление увеличенной секреции» (см. № 3 списка литературы, с. 578—615). Опыт проводят на той же кошке через 15—20 мин после окончания опыта с раздражением симпатического нерва.

Ход работы. 1. Подвести электроды под барабанную струну и раздражать ее в течение 15 с, используя максимальные параметры раздражения (см. опыт 1, пункт 6).

2. Сразу же по окончании раздражения перенести электроды под шейный симпатический нерв и раздражать его в течение 15 с, используя максимальные параметры раздражения симпатического нерва, обнаруженные в предыдущем опыте. Повторить опыт 2—3 раза с интервалом в 3—5 мин.

Обработка результатов. Сравнивают результаты, полученные при первичном раздражении симпатического нерва и после предварительного возбуждения барабанной струны. Обычный эффект в таких случаях — увеличение секреции во 2-м варианте опыта. Продумывают и проводят в качестве контрольных экспериментов другие сочетания и последовательности раздражения барабанной струны и симпатического нерва.

Объясняют эффекты увеличенной секреции, учитывая особенности парасимпатической и симпатической иннервации подчелюстной железы кошки.

Опыт 4. Действие пилокарпина на слюноотделение подчелюстной железы кошки

Пилокарпин вызывает обильное слюноотделение. Предполагают, что по отношению к слюнным железам он действует как холиномиметик. Опыт проводят через 15 мин после окончания предыдущих экспериментов.

Ход работы. 1. Включить регистрационную систему, подвести отметчики времени и раздражения. Ввести в бедренную вену с помощью шприца 0,3 мл 0,1%-ного раствора пилокарпина.

2. Поскольку пилокарпин вызывает длительный эффект слюноотделения, действие его на подчелюстную железу может длиться 35—40 мин. Записать на кимографе начальный эффект действия пилокарпина. Отметить в протоколе длительность латентного периода. Остановить барабан и следить за писчиком. После того как он, поднимаясь вверх, пересечет несколько горизонтальных линий, отметить в протоколе крутизну нарастания эффекта слюноотделения и количество выделившейся слюны. Опустить писчик на исходный уровень и вновь зарегистрировать эффект слюноотделения на неподвижном барабане. Подобные записи вести до прекращения слюноотделения.

Обработка результатов. Отмечают в протоколе длительность действия пилокарпина. Сравнивают действие пилокарпина и раздражения барабанной струны на подчелюстную железу кошки. Отмечают сходство и отличия в действии указанных факторов. Объясняют механизм наблюдаемых явлений.

Опыт 5. Раздражение парасимпатического и симпатического нервов на фоне атропина

Атропин — М-холинолитик, он выключает действие парасимпатической системы на эффекторные органы.

Ход работы. 1. Ввести в бедренную вену 1 мл 0,1%-ного атропина.

2. Подготовить регистрационную систему к записи на кимографе, подвести электроды под барабанную струну. Через 3 мин после введения атропина включить барабан, отметчик времени и раздражения. Раздражать барабанную струну в течение 25 с, используя максимальные параметры раздражения (см. опыт 1, пункт 6). Повторить опыт 2 раза с интервалом в 3—5 мин. Отметить в протоколе эффект раздражения барабанной струны на фоне атропина.

3. Снять парасимпатический нерв с электродов и подвести их под шейный симпатический нерв. Подготовить систему к регистрации. Включить кимограф, отметчик времени и отметчик раздражения.

4. Провести раздражение симпатического нерва в течение 15 с, используя максимальные параметры раздражающего тока (см. опыт 1, пункт 6). Повторить раздражения 2—3 раза с интервалом в 3 мин.

5. Через 5—10 мин после окончания опытов с раздражением симпатического нерва ввести в бедренную вену 0,5 мл 0,1%-ного раствора пилокарпина. Наблюдать в течение 10—15 мин за эффектом действия пилокарпина на фоне атропина.

Обработка результатов. Отмечают в протоколе латентный период, крутизну нарастания слюноотделения, количество выделившегося сока, наличие или отсутствие эффекта последействия. Сравни-

вают кривые слюноотделения, полученные при раздражении симпатического нерва до и после введения атропина. Объясняют наблюдаемые явления. Объясняют отсутствие эффекта слюноотделения при раздражении барабанной струны и введении пилокарпина на фоне атропина.

Анализируют все результаты, полученные при выполнении задачи. Отмечают сходство и различия в эффектах действия нервных и гуморальных агентов по исследованным показателям. Объяснить обнаруженные факты с учетом особенностей парасимпатической и симпатической иннервации подчелюстной железы. Высказать свои соображения о месте и механизме действия гуморальных агентов — атропина и пилокарпина.

ТЕМА II. ОПЕРАЦИЯ МАЛОГО ЖЕЛУДОЧКА

Операция малого желудочка, разработанная И. П. Павловым, заключается в изоляции части желудка с максимальным сохранением его иннервации и кровообращения. Такие желудочки используют в хроническом эксперименте для изучения количественного и качественного анализа желудочного сокоотделения при различных пищевых режимах, нервно-гуморальных механизмов регуляции деятельности желудочных желез и др. Операции павловских желудочков, изолированных из различных частей желудка, дали возможность изучить функциональную топографию желудка и особенности секреторной активности различных его частей.

Для правильного выполнения операции малого желудочка необходимо учитывать особенности кровоснабжения и иннервации желудка. Все артерии, снабжающие желудок, отходят либо от утробной артерии *a. coeliaca* (главная ветвь брюшной аорты *a. abdominalis*), либо от печеночной артерии *a. hepatica*, являющейся ветвью утробной артерии. Малая кривизна получает кровь от левой и правой желудочных артерий *a. gastrica sinistra, dextra*, идущих навстречу друг другу, между которыми имеется множество анастомозов (рис. 157). Большая кривизна снабжается правой и левой желудочно-сальниковыми артериями, *a. gastroepiploica dextra, sinistra*, ток крови в которых также противоположен, обе ветви связаны анастомозами. Эти особенности необходимо учитывать при перевязке сосудов во время операции. Пилорическая часть желудка снабжается правой желудочной артерией на малой кривизне и правой желудочно-сальниковой артерией на большой кривизне, между этими двумя артериями имеется незначительное число анастомозов. Ответвления от этих крупных артерий пронизывают мышечный покров и образуют богатое подслизистое артериальное сплетение. От них отходят снаружи небольшие разветвления, питающие мышечный слой и многочисленные ветви, питающие слизистую оболочку и расположенные в ней желудочные железы.

Структура мелких желудочных артерий и артериол отличается специфическими особенностями: они

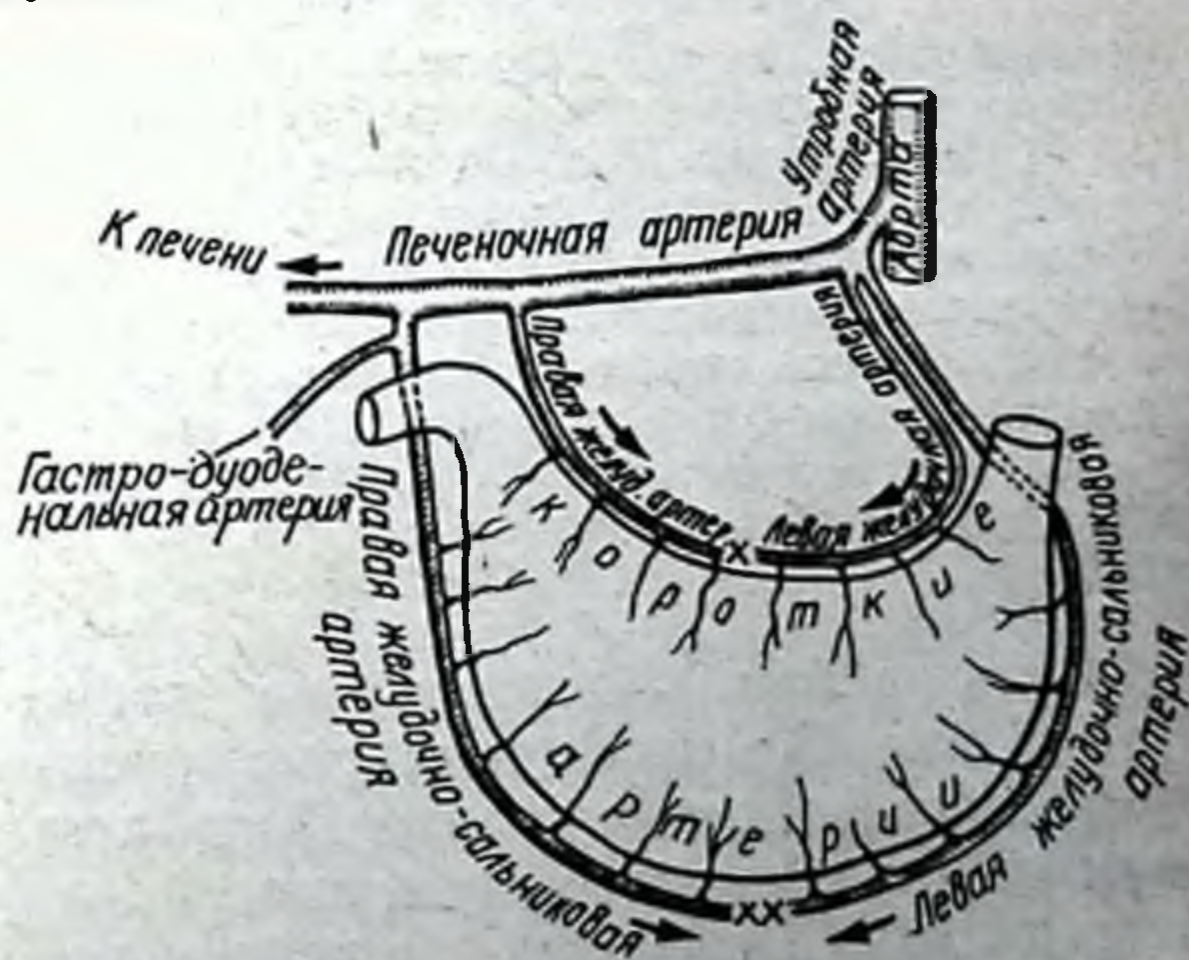


Рис. 157. Артериальное снабжение желудка. Крестиками обозначены места анастомозов, стрелками — направление тока крови

образуют фигуры, напоминающие спирали и завитки в виде восьмерок. Эти особенности являются своеобразным дополнением к обычному сосудосуживающему механизму артерий. В сократившемся желудке они повышают сопротивление артериальному току крови, и прилив крови к слизистой оболочке уменьшается. В растянутом желудке завитки выпрямляются, допуская резко приток крови к артериям слизистой оболочки. В слизистой оболочке артериолы переходят в капилляры. Из капилляров кровь сначала поступает в так называемое поверхностное венозное сплетение, затем ход венозных сосудов идет параллельно артериальным.

Важная особенность кровоснабжения желудка заключается в том, что перерезка значительного числа артерий (с сохранением основных артериальных стволов) при выполнении операций на желудке не вызывает серьезных нарушений в его секреторно-двигательной деятельности у хронически оперированного животного. Это объясняется относительно быстрым восстановлением кровеносных сосудов и, соответственно, кровоснабжения в различных частях желудка, подвергнутых операции.

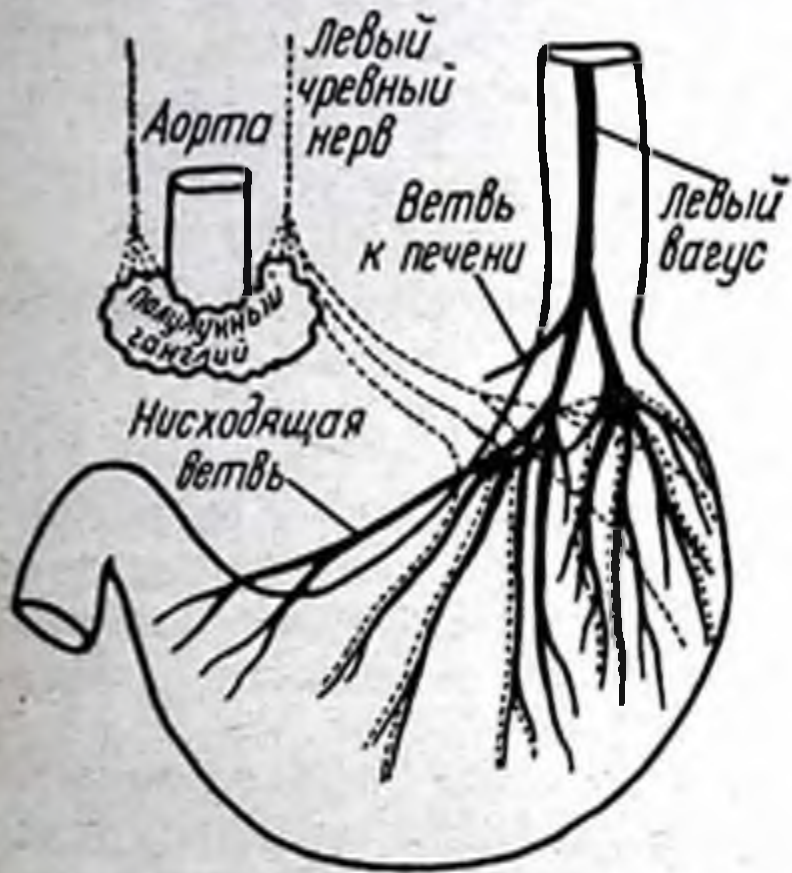


Рис. 158. Иннервация желудка (сплошными линиями обозначен блуждающий нерв, прерывистыми — симпатическая иннервация)

Желудок иннервируется блуждающим и симпатическим нервами. Оба ствола блуждающего нерва — передний и задний, начинаются с вагусных сплетений в пищеводе, образованных левым и правым блуждающими нервами и расположенных на передней и задней поверхности пищевода, несколько выше диафрагмы. От переднего (или левого) ствола блуждающего нерва после его прохождения через диафрагму отходят ветви, иннервирующие различные части желудка: малую кривизну, тело и дно желудка. Задний (или правый) ствол блуждающего нерва спускается вдоль дорзальной поверхности пищевода, распределение его ветвей по дорзальной поверхности желудка сходно с распределением ветвей переднего ствола блуждающего нерва (рис. 158).

Волокна блуждающего нерва представляют собой преганглионарные волокна, они заканчиваются в миэнтеральном pl. mientericus, или ауэрбаховом, сплетении на клетках Догеля I типа, являющихся вторичными нейронами парасимпатической системы. Постганглионарные волокна подходят к гладкомышечным клеткам и к железистым элементам желудка.

Симпатическая иннервация желудка обеспечивается волокнами, идущими преимущественно в составе чревных нервов. Преганглионарные волокна симпатической нервной системы оканчиваются на клетках превертебральных ганглиев и ганглиев солнечного сплетения. Постганглионарные волокна достигают желудка либо вместе с ветвями блуждающего нерва, либо проходят вдоль кровеносных сосудов. Они заканчиваются на мышечных и железистых клетках желудка.

Цель работы. Повторить на кошке классическую операцию И. П. Павлова. Познакомиться с основными приемами операции на желудочно-кишечном тракте. Приобрести навыки, необходимые для выполнения стерильной операции на собаке. Выполнить на собаке в стерильных условиях модификацию павловского желудочка. Ознакомиться с методами работы в стерильных условиях.

Задача 1. Операция малого желудка по методу И. П. Павлова

Методика. Основные инструменты и материалы. Аппарат для искусственного дыхания; трахеотомическая трубка; ножницы большие изогнутые для стрижки шерсти 1; ножницы средние 1; ножницы глазные 1; скальпель брюшистый 2; желудочные жомы 4; зажимы Пеана 4; пинцеты анатомические 2; круглые кишечные иглы; круглые режущие иглы; иглодержатели 2; шелковые нитки толстые и тонкие; чашки Петри; ватные тампоны; марлевые салфетки; раствор Рингера для теплокровных; спирт; иод; 5%-ный раствор аммиака, 0,1%-ный раствор сулемы.

Подготовка к операции. Операцию выполняет группа студентов из 4 человек. Перед операцией, обсудив все ее этапы с преподавателем, в группе выделяют: хирурга, ассистента, хирургическую сестру и анестезиолога. При проведении острой операции обязанности членов группы могут меняться. За день до операции члены группы подготавливают инструменты и материалы: проверяют, достаточно ли остры инструменты; подбирают нитки по диаметру, подходящие к ушку круглых и режущих игл; изучают правила работы с иглодержателем; учатся вставлять нитку в ушко игл; готовят растворы, ватно-марлевые тампоны, марлевые салфетки и т. д. Для успешного проведения операции очень важно на одном из ее этапов хорошо пережать жомом желудок — при этом пережимаются кровеносные сосуды и нет необходимости их перевязывать, что облегчает и упрощает операцию. Чтобы жомы хорошо пережали живую ткань и не повреждали ее, на них надевают подходящие по диаметру резиновые трубки.

Операция на кошке является подготовкой к проведению стерильной операции на собаке, поэтому все этапы операции нужно максимально приблизить к условиям стерильности.

Перед операцией хирургическая сестра на отдельном столике раскладывает инструменты, иглы, нитки, иглодержатели, ватно-марлевые тампоны, марлевые салфетки, растворы, необходимые во время операции. Нитки при выполнении острой операции нужно держать в чашках Петри в воде, сухими нитками шить живые ткани нельзя (нитка будет рвать ткань).

Проведение операции. Во время операции хирург находится в центре операционного стола, по правую сторону от головы животного, ассистент — напротив; рядом с ассистентом, у головы животного около столика с инструментами — хирургическая сестра, она подает инструменты и материалы, необходимые по ходу операции, подготавливает иглы к шитью. Анестезиолог весь период операции следит за уровнем наркоза животного. Операцию проводят на кошке, голодавшей в течение суток.

При операциях на желудке и кишечнике успех операции во многом зависит от правильного сшивания тканей. При этом нужно соблюдать определенные правила.

1. При наложении отдельных швов для погружения участка слизистой или в местах кровотечения нужно с двух сторон от указанных участков сделать два стежка и концы нитки одного стежка связать с концами другого двойным узлом (выступ слизистой может привести к последующему разъеданию раны выделяющимся кислым желудочным соком).

2. При наложении непрерывного шва необходимо в начале «шитья» при первых двух стежках, стягивающих края слизистой или мышечных слоев, завязать двойным узлом два конца нитки, а затем длинным ее концом продолжать наложение погружного шва. В конце «шитья» также нужно связать концы ниток, иначе шов разойдется. Все узлы завязывают дважды (второй узел — двойной). При погружном шве с подслизистой стороны кишечной иглой стежки накладывают параллельно краю разреза слизистой, сначала с одной стороны, затем — с другой. Прокалывать слизистую нельзя — нарушится стерильность операции и в случае хронической операции это может привести к воспалительному процессу (рис. 159). Стежки делает хирург, задача ассистента заключается

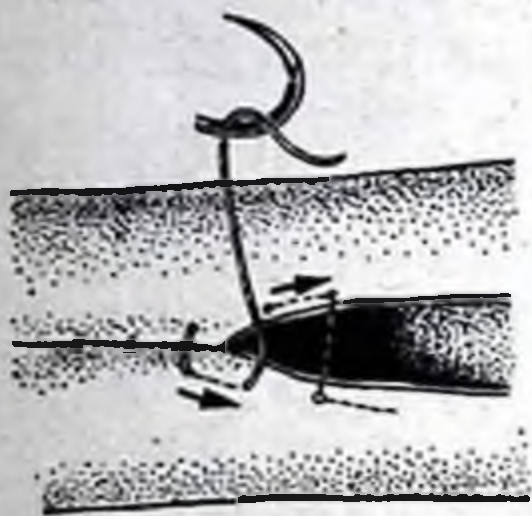


Рис. 159. Один из видов погружного шва

в том, чтобы после каждого стежка плотно натягивать нить по ходу шва (ткань как бы насаживается на нитку), погружая слизистую внутрь, в противном случае шов в результате перистальтики желудка может разойтись. В случае правильного сшивания слизистой или мышечного слоев нитка по окончании «шитья» не видна.

3. При кровотечении нужно захватить кровоточащий участок зажимом Пеана и оставить его на несколько минут. Затем снять зажим, если кровотечение продолжается, вновь наложить зажим, слегка подтянуть и под ним перевязать. В случае сильного кровотечения нужно перевязать сосуды вокруг кровоточащего участка.

Ход работы. Наркотизацию животного и фиксацию на операционном столе проводят, как в задаче темы I.

2. Производят трахеотомию (на случай необходимости искусственного дыхания).

3. Подготавливают операционное поле: в области средней линии живота (на 3 см выше и на 5—6 см ниже мочеvidного отростка) ножницами ассистент срезает шерсть так, чтобы ширина обнаженной области была примерно 4—5 см; с помощью ватных тампонов протирает операционное поле сначала спиртом, потом иодом; покрывает кошку простыней, в средней части которой имеется вырез площадью с операционное поле.

4. Строго по средней линии, чтобы не задеть кровеносные сосуды, отступя на 1 см от мочеvidного отростка, хирург острым брюшным скальпелем разрезает кожу на расстоянии 4—5 см (до пупочного узла). Кожный разрез очень болезненный, поэтому необходимо, чтобы животное в этот период находилось под глубоким наркозом. Разрез должен быть ровным, не «рванным», что облегчит заживление ран у животных после операций. Для этого скальпель располагают на коже параллельно линии разреза, указательным пальцем упираются на начало лезвия и одним сильным движением руки производят кожный разрез. Тупым концом скальпеля хирург (с помощью ассистента) слегка отсепаровывает кожу в обе стороны и по белой линии (апоневроз) разрезает мышечную стенку живота. Чтобы не повредить органы брюшной полости, этот разрез делают так: в средней части будущего разреза хирург приподнимает мыш-

цу большим анатомическим пинцетом и делает небольшой надрез мышц скальпелем. В образовавшееся отверстие вводит левый указательный палец и под его контролем ножницами расширяет разрез в обе стороны до границ кожного разреза (следить, чтобы края раны были ровными). К краям кожного разреза с двух сторон хирург с помощью ассистента толстой кожной иглой и толстой ниткой отдельными швами пришивает марлевые салфетки. Эти швы нужно завязывать одним узлом, не очень сильно натягивая нитки, чтобы в конце операции их легко можно было снять. Салфетки покрывают всю брюшную часть животного, между салфетками остается брюшной разрез. Это предохраняет при дальнейшей операции внутренние органы от соприкосновения с брюшной поверхностью.

Подтянув внутренний мышечный слой — брюшину, хирург прошивает ее круглой иглой и берет на лигатуру, на которую накладывает зажим Пеана. (Эта процедура облегчит сшивание брюшины в конце операции, иначе этот тонкий эластичный слой мышц трудно достать, он «утягивается» внутрь брюшной полости.)

5. Осторожно, отодвинув сальник в сторону, хирург извлекает желудок вместе с селезенкой и помещает его на салфетки, смоченные теплым физиологическим раствором (в течение всей операции желудок, селезенку и все ткани постоянно смачивать теплым раствором). Желудок расправляют, рассматривают его малую и большую кривизну, фундальную, кардиальную и пилорические части. Определяют место будущего разреза желудка и по обе стороны от предполагаемого разреза накладывают жомы, следя за тем, чтобы соответствующие области желудка были полностью пережаты (рис. 160). Расстояние между жомами должно составлять около 1,5 см¹.

6. По средней линии, между жомами, которые держит ассистент, брюшистым скальпелем хирург разрезает переднюю мышечную стенку желудка, оставляя нетронутым верхний участок — мостик шириной 1,5—2 см. В этом участке проходят основные нервные стволы парасимпатической и симпатической систем, а также кровеносные сосуды (см. рис. 157). Края разреза должны быть ровными. Затем ножницами аккуратно хирург разрезает слизистую оболочку передней стенки (рис. 161). Ассистент следит, чтобы содержимое желудка не попало в брюшную полость! Для этого до начала разреза он помещает под желудок несколько слоев марлевых салфеток и тампонами, смоченными в растворе сулемы, аккуратно протирает все участки слизистой оболочки. Затем ассистент приподнимает желудок за жомы, а хирург повторяет всю операцию с той же последовательностью на задней стенке желудка.

7. Оставшийся между двумя частями желудка (большим и маленьким) мышечный мостик хирург выворачивает с помощью сред-

¹ Операция на кошке — учебная. Так как у кошки желудок значительно меньше, чем у собаки, соотношения между величиной большого и малого желудков, а также мостика, характерные для павловской операции на собаке, полностью не сохраняются.

него пальца левой руки так, чтобы слизистая оболочка оказалась наружу. По средней линии скальпелем (осторожно, чтобы не порезать палец!) он разрезает слизистую по всей ширине перешейка (рис. 162). Не вынимая пальца, отсепаровывает слизистую с двух сторон от разреза. Эту часть операции делают так: ассистент двумя

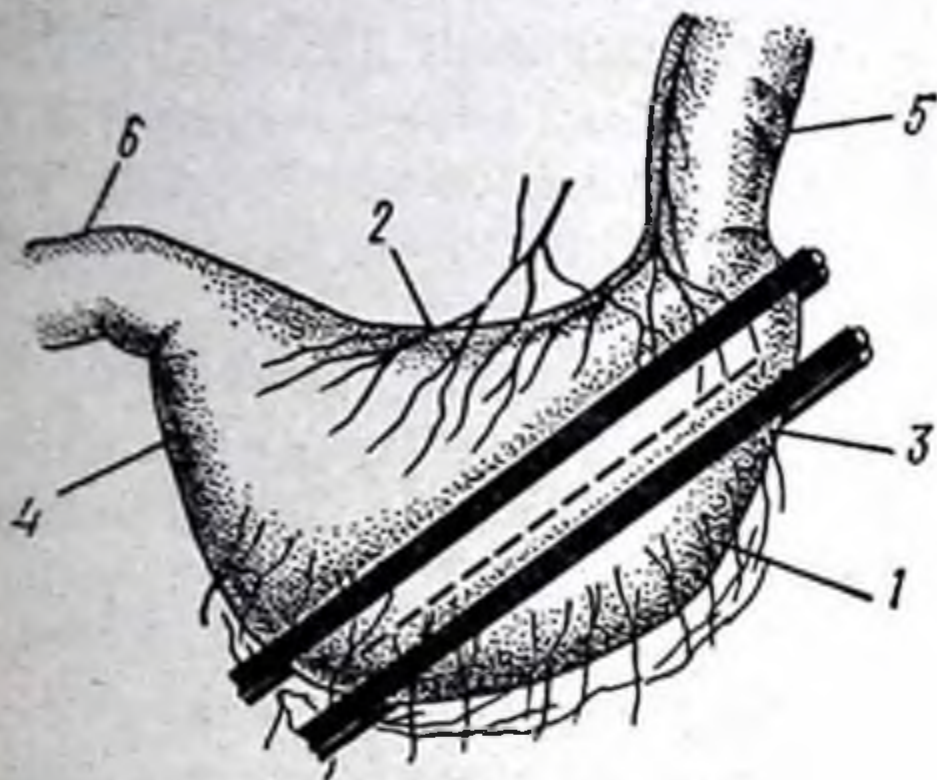


Рис. 160. Наложение жомов на желудок кошки:

1 — большая кривизна, 2 — малая кривизна, 3 — фундальная часть, 4 — пилорическая часть, 5 — пищевод, 6 — двенадцатиперстная кишка; пунктиром обозначена линия будущего разреза

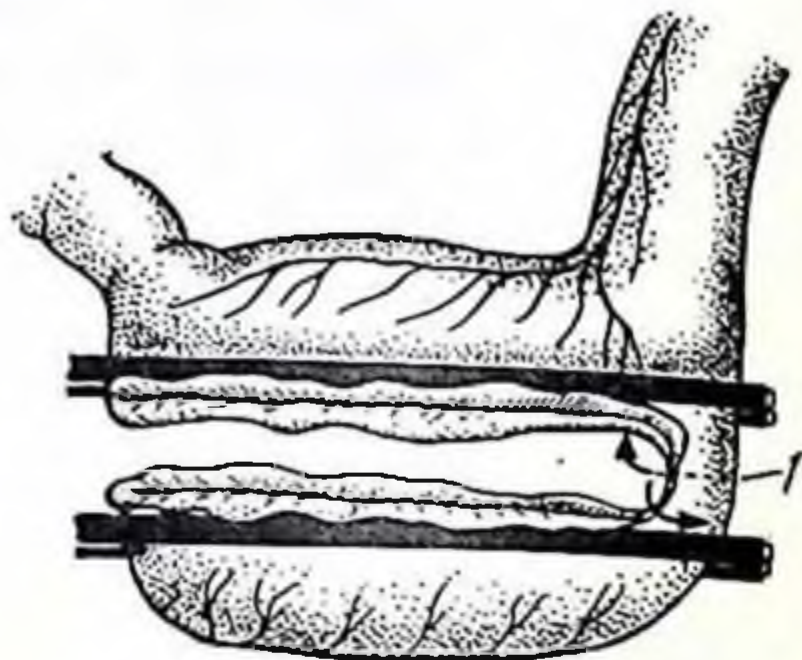


Рис. 161. Разрез мышечных и слизистых слоев:

1 — «мостик», соединяющий большой и малый желудки

тонкими анатомическими пинцетами осторожно подтягивает кусочек слизистой, расположенный ближе к большому желудку, начиная с одного конца разреза, а хирург тонкими ножницами подсекает слизистую на границе с мышечным слоем. Затем ассистент подтягивает рядом расположенный участок слизистой и так по всей линии разреза. То же делают со слизистой, обращенной к малому желудку, пока по обе стороны от разреза не образуются две складки слизистой, каждая шириной в 5 мм, и обнажится мышечный мостик шириной в 1 см (рис. 162).

8. Восстановление целостности большого желудка: на складку отсепарованной слизистой оболочки верхней части большого желудка со стороны подслизистой наложить два кисетных шва в шахматном порядке. Делать это так: ассистент двумя тонкими анатомическими пинцетами захватывает слизистую так, чтобы расстояние между пинцетами было равно одному стежку иглой. Ассистент слегка растягивает слизистую в сторону желудка так, чтобы хирургу было удобно сделать иглой стежок со стороны подслизистой (прокалывать слизистую насквозь нельзя — нарушится стерильность операции). При наложении 1-го стежка кисетного шва сохраняют один конец нитки. Стежки берутся длиной примерно 3 мм с таким же расстоянием между ними. Ассистент после каждого стежка осторожно натягивает нитку по ее ходу. По окончании наложения 1-го кисетного шва 2-й конец нитки также сохраняют.

Параллельно 1-му шву на расстоянии около 3 мм от него накладывается 2-й кисетный шов в шахматном порядке по отношению к 1-му. Затем поочередно, начиная со шва, расположенного ближе к краю слизистой, хирург затягивает сначала 1-й кисетный шов, (ассистент заправляет внутрь слизистую) и завязывает концы нит-

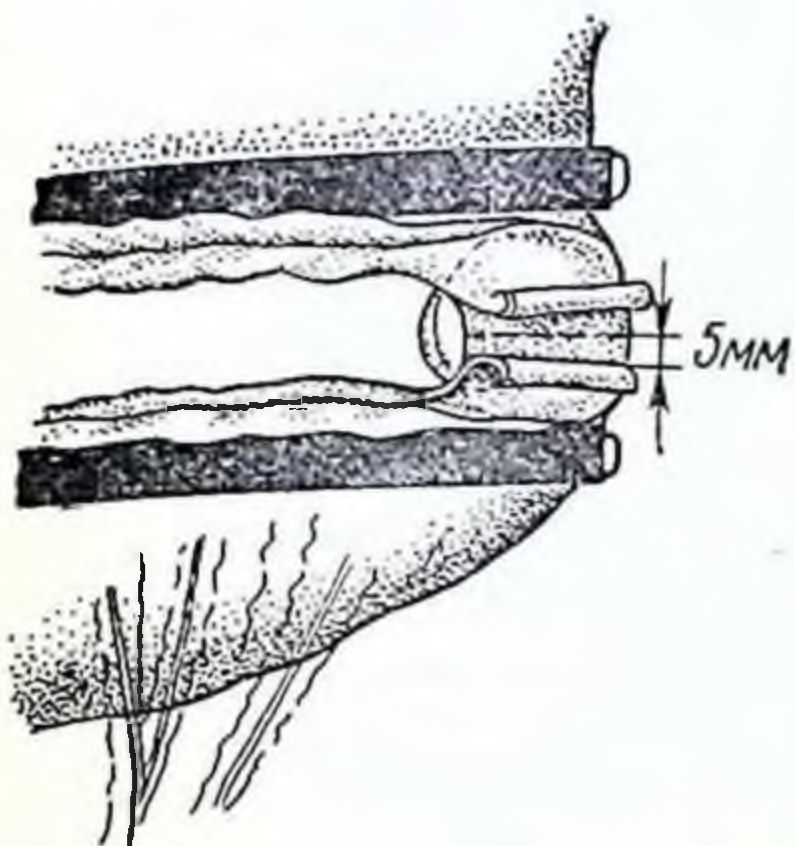


Рис. 162. Отсепаровка слизистой слоя на «мостике»

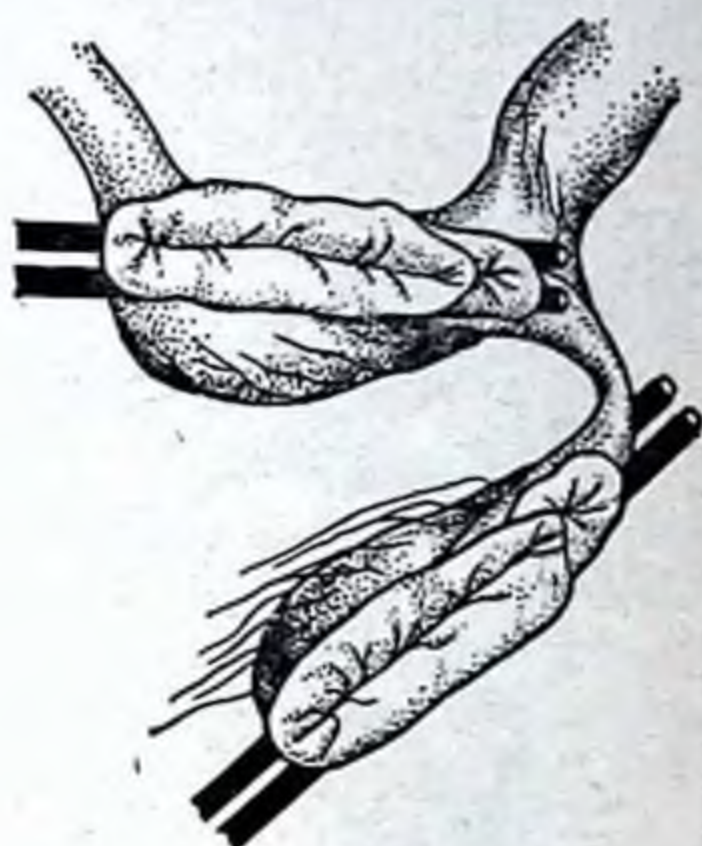


Рис. 163. Наложение кисетных швов на мышечный «мостик» и сшивание мышечного слоя

ки двумя узлами, потом затягивает и завязывает двумя узлами 2-й кисетный шов. При этом образуется свод — «крыша» большого желудка (рис. 163). Иглой с длинной ниткой хирург прошивает подслизистую с двух сторон от основания свода, ассистент связывает короткий конец нитки, оставшийся после 1-го стежка с ее длинным концом, продетым в ушко иглы. Этой же ниткой хирург непрерывным швом сшивает края слизистой оболочки большого желудка. Шов должен быть погружным; ассистент натягивает нитку после каждого стежка по ходу шва (иначе она будет прорывать ткани). При наложении последнего стежка нитку затягивают не до конца, оставляют петлю и связывают ее с концом нитки двойным узлом. Внимательно осматривают шов. В тех местах, где небольшие участки слизистой выступают наружу, накладывают дополнительные узловые швы.

9. Восстановление целостности малого желудочка производят, в основном, по той же схеме, описанной для большого желудка: накладывают два кисетных шва на складку слизистой в верхней части желудочка (со стороны подслизистой), формируют своды, оставляя при сшивании слизистой оболочки в нижней части желудочка небольшое отверстие. В операции, предложенной И. П. Павловым, этот открытый конец малого желудочка выводится наружу.

10. На мышечный мостик, объединяющий большой и малый желудки, накладывают два кисетных шва в шахматном порядке, концы каждого шва слегка затягивают и завязывают двойным узлом

(рис. 164): образуется мышечная трубка, соединяющая оба желудка.

11. Восстанавливают целостность мышечной стенки большого желудка, мостика и малого желудка. С помощью длинной прочной нитки и средней режущей иглы зашивают непрерывным погружным швом мышечные слои сначала большого желудка, затем мостика и

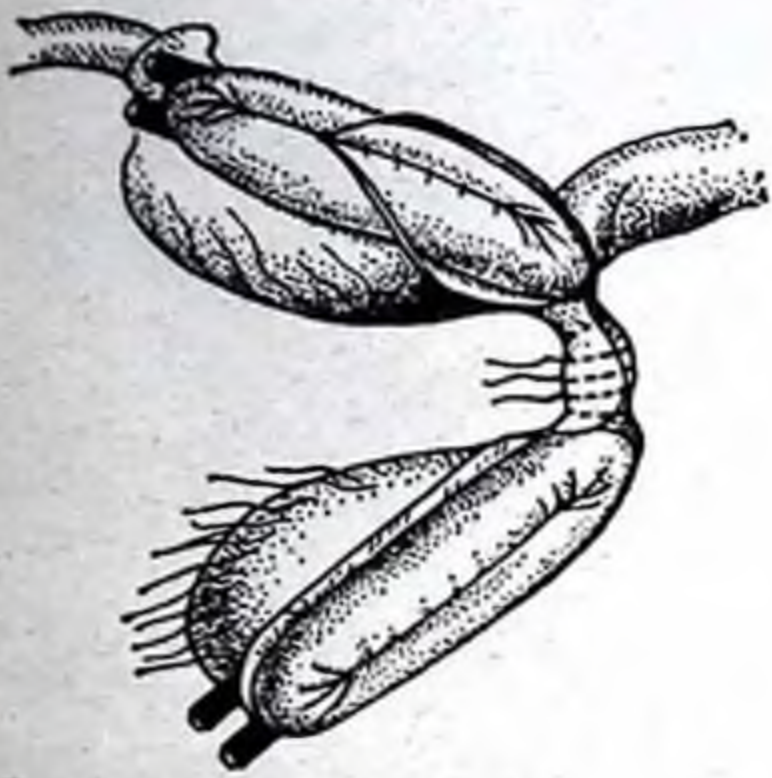


Рис. 164. Формирование сводов (объяснение см. в тексте)

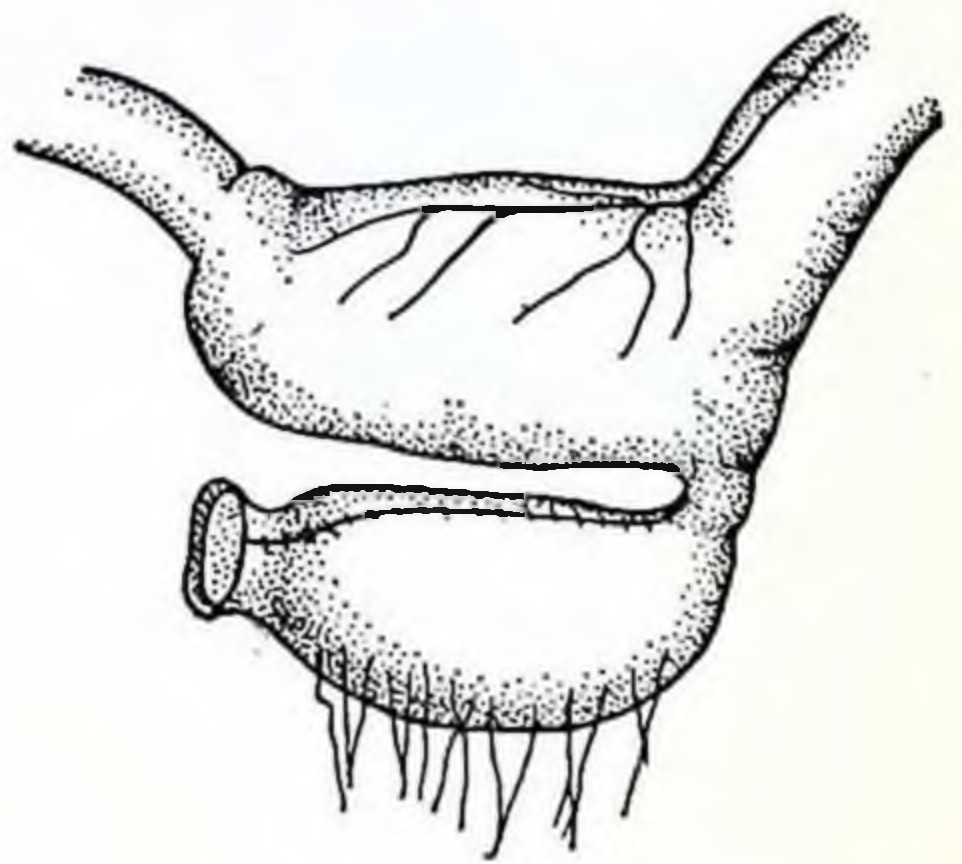


Рис. 165. Большой и малый желудки после восстановления целостности мышечных слоев (в маленьком желудке оставлено отверстие для выведения в кожную рану)

малого желудка. Правила «шитья» такие же, как при сшивании слизистой оболочки: стежки берут с наружных сторон мышечных складок, связывают 1-й шов, шов накладывают погружной, при последнем стежке связывают петлю этого стежка со свободным концом нитки (как и при сшивании слизистых оболочек малого желудка, мышечный слой сшивают не до конца, оставляя небольшое отверстие). Тщательно закрывают отверстие марлевыми салфетками, чтобы при снятии жомов содержимое желудочка не попало в брюшную полость (рис. 165). Снимают жомы. Проверяют прочность мышечного шва по отсутствию кровотечения (в кровоточащих местах накладывают отдельные швы). Промывают наружную поверхность желудка теплым физиологическим раствором.

12. Большой и малый желудки заворачивают в сальник и осторожно вместе с селезенкой погружают в брюшную полость. Открытый конец малого желудка выводят на 5—6 мм наружу в центр раны. Восстанавливают целостность брюшной стенки: сначала непрерывным швом сшивают брюшину (ее подтягивают за зажимы Пеана), начиная от одного края разреза, иглой захватывают мышцу малого желудочка (отступя на 5—6 мм от отверстия) и продолжают сшивать брюшину до конца разреза. Затем таким же способом сшивают мышечные слои, также в центре раны захватывая 2—3 стежками мышцу малого желудочка около отверстия.

13. С краев кожного разреза срезают ножницами узловые швы, которыми к краям разреза в начале операции были пришиты салфетки, и снимают их. Для наложения кожных швов края кожного разреза пальцами приподнимают, соединяют их внутренними сторонами так, чтобы края кожи были наружу, и толстой кожной иглой с короткими толстыми прочными нитками, прокалывая оба слоя кожи на расстоянии 4—5 мм от края, накладывают отдельные узловые кожные швы, завязывают их двумя узлами, не очень сильно затягивая первые узлы, чтобы не повреждать кожную поверхность (эти узлы в условиях стерильной операции снимают через несколько дней после операции). При наложении кожных швов осторожно подтягивают открытый конец желудка к краю раны, так чтобы он на 2—3 мм выходил наружу. Каждый кожный шов смазывают иодом.

Обработка результатов. По окончании операции продумывают все ее этапы, заносят в протокол основные моменты операции. Отмечают наиболее сложные этапы или неудачные моменты, все замечания по ходу операции. Нужно помнить, что проводимая операция — подготовка к хронической операции на собаке.

Задача 2. Новая облегченная операция павловского желудка¹

Студентам после выполнения классической операции маленького желудка по И. П. Павлову предоставляется возможность выполнить свою модификацию операции маленького желудка, познакомившись с некоторыми модификациями по литературным источникам.

В основу одной из студенческих модификаций взята методика Ю. Н. Успенского (1954) и метод инфильтрации А. М. Уголева (1957). Предложенная студентами операция состоит в следующем: по передней стенки желудка производят продольный разрез ближе к большой кривизне. Под слизистую оболочку обнаженной задней стенки желудка на месте будущего разреза шприцем нагнетается физиологический раствор, между слизистой и мышечной тканями образуется инфильтрат — валик толщиной 1—1,5 см. Он предохраняет от разреза мышечную стенку с проходящими в ней нервами и сглаживает складчатость слизистой, упрощая ее разрез. Слизистая разрезается скальпелем, и легко отходит от серозно-мышечного слоя. Целостность большого желудка восстанавливают сшиванием слизистых оболочек передней и задней стенок. Маленький желудочек формируют также за счет слизистой передней и задней стенок. Сшивают переднюю мышечную стенку, так что в одном мышечном мешке оказываются оба желудка, отделенные друг от друга двойной стенкой из слизистых оболочек. В маленький желудочек вставляют фистулу.

Преимущество этой операции перед павловской состоит в сохранении неповрежденной всей задней стенки желудка, чем достигается более прочная связь между большим и малым желудками и сохраняется большая часть нервных волокон. Кроме того, эта операция легче и быстрее выполняется студентами. Как правило, животные после операции (при тщательном послеоперационном уходе) выживают и пригодны для изучения механизма пищеварения в желудке.

Методика. Необходимые инструменты и материалы. Ножницы большие изогнутые для стрижки шерсти — 1, бритва — 1, помазок,

¹ Эта модификация разработана студентами кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ.

мыльный порошок; ножницы средние — 1, ножницы глазные — 1, скальпель брюшистый — 2, желудочные жомы — 4, зажимы Пеа-на — 6, пинцеты анатомические — 4, круглые кишечные иглы, круглые режущие иглы, иглодержатели — 2, фистула, шелковые нитки тонкие и толстые, чашки Петри, простыня для собаки с отверстием; раствор Рингера для теплокровных, спирт, иод, 0,5%-ный раствор аммиака, 0,1%-ный раствор сулемы.

Подготовка к операции. Подготовку к операции ведут по плану задачи 1 с учетом добавлений, связанных со стерильностью операции. За несколько дней до операции подробно знакомятся с техникой стерилизации инструментов, материалов, белья, рук, подбором животных, дооперационного и послеоперационного ухода за собакой, с описанием хирургических инструментов, устройством желудочных фистул, общими приемами хронических операций (см. № 23 и 38 в списке литературы). Обращают внимание на условия сохранения стерильности органов брюшной полости при вскрытии желудка и кишечника, способы борьбы с кровотечениями, технику перевязки сосудов. Петля лигатуры с помощью пинцета подводится под кровеносный сосуд, в центре перерезается. Каждый отрезок нити используют для перевязки сосуда. Перерезку сосуда делают между перевязками.

Для операции берут беспородных собак массой 10—12 кг. Не кормят их до операции в течение суток. Накануне операции, вечером, собаку тщательно моют и оставляют в чистом помещении.

Стерилизацию материалов можно проводить накануне операции. Халаты, колпаки для участников операции, простыни для собаки, полотенца, салфетки укладывают в один бикс. В другой бикс складывают марлевые салфетки 20×30, марлевые тампоны 8×8 или 10×10, палочки с намотанной ватой для смазывания операционного поля. Биксы стерилизуют в автоклаве под давлением 1—1,5 атм в течение 1 ч.

Стерилизацию нережущих инструментов производят кипячением в воде с содой (0,5—1%-ный раствор) в отдельном стерилизаторе. Режущие инструменты стерилизуют в ванночке со спиртом за 30 мин до операции. Стерилизацию ниток производят следующим образом: нитки, отмотанные на стеклянные палочки или пластинки, на ночь перед операцией кладут в сулемовый спирт (раствор сулемы 1 : 1000), в день операции кипятят вместе с инструментами и затем держат их в хорошо закрытых банках со спиртом.

Проведение операции.

Три участника операции весь период операции сохраняют условия стерильности. 4-й — анестезиолог, «нестерильный», помимо своих основных обязанностей выполняет все подсобные работы: подогревает физиологический раствор, заменяет инструменты, потерявшие стерильность во время операции, и др. Хирургическая сестра подготавливает на отдельном столике инструменты, материалы, ватно-марлевые тампоны, растворы, иглы, нитки и др. Все режущие инструменты, иглы и нитки находятся в течение операции в спирту.

Ход работы. 1. В день операции ввести собаке морфий, 10 мг/кг массы, внутримышечно. Через 30—40 мин после введения морфия у собаки происходит дефекация и рвота. После этого ввести собаке нембутал (40 мг/кг) внутривенно.

2. Фиксацию животного на большом операционном столе и все процедуры, связанные со стрижкой и выбриванием шерсти, делать в предоперационной.

3. Вскрытие брюшной полости произвести так, как описано в задаче 2. Разрез брюшной стенки сделать длиной 10—15 см.

4. Осторожно, отодвинув сальник в сторону, извлечь желудок вместе с селезенкой и поместить на салфетки, смоченные теплым физиологическим раствором (в течение всей операции желудок смачивать теплым физиологическим раствором). Селезенку накрыть влажной салфеткой и в течение всей операции периодически смачивать теплым физиологическим раствором. Определить место будущего разреза желудка и по обе стороны от предполагаемой линии разреза наложить жомы (рис. 166). Сосуды, идущие по брыжейке и желудку, в местах будущего разреза перевязать двумя лигатурами и между лигатурами разрезать. Перевязку сосудов лучше производить следующим образом: в месте перевязки сосуда с помощью глазного пинцета хирург подводит сложенную вдвое (так, что образуется петля) тонкую короткую нитку. Ассистент захватывает петлю пинцетом, тонкими ножницами разрезает ее на две части, берет одну нитку и завязывает ее на сосуде двойным узлом, хирург берет 2-ю нитку и также завязывает ее на сосуде. Между перевязками сосуд перерезают, концы ниток отрезают так, чтобы кончики ниток у места перевязки были длиной 4—5 мм. Если под сосуд трудно подвести пинцет, его прошивают с двух сторон с помощью тонкой иглы (захватывая участки ткани под сосудом) и перевязывают в двух местах.

5. Разрезать по средней линии между жомами брюшным скальпелем всю переднюю мышечную стенку желудка. Край раз-

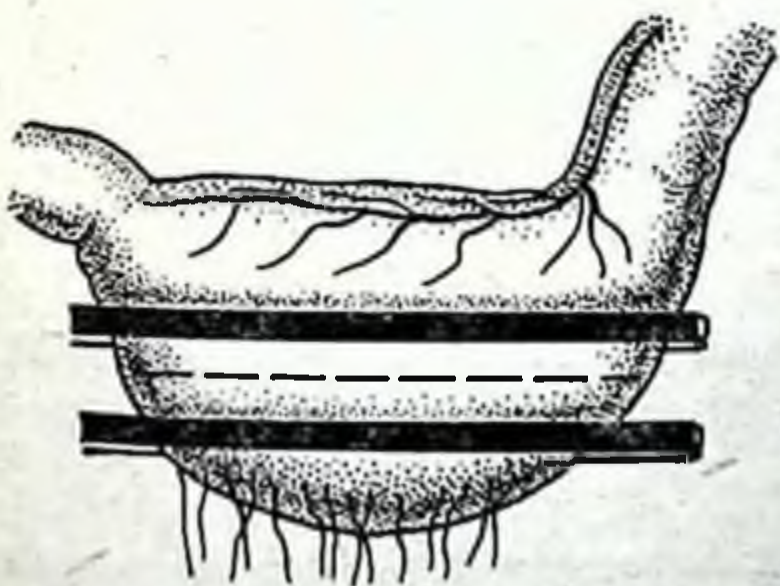


Рис. 166. Наложение жомов и линия разреза передней стенки желудка при выполнении облегченной модификации павловского желудочка на собаке

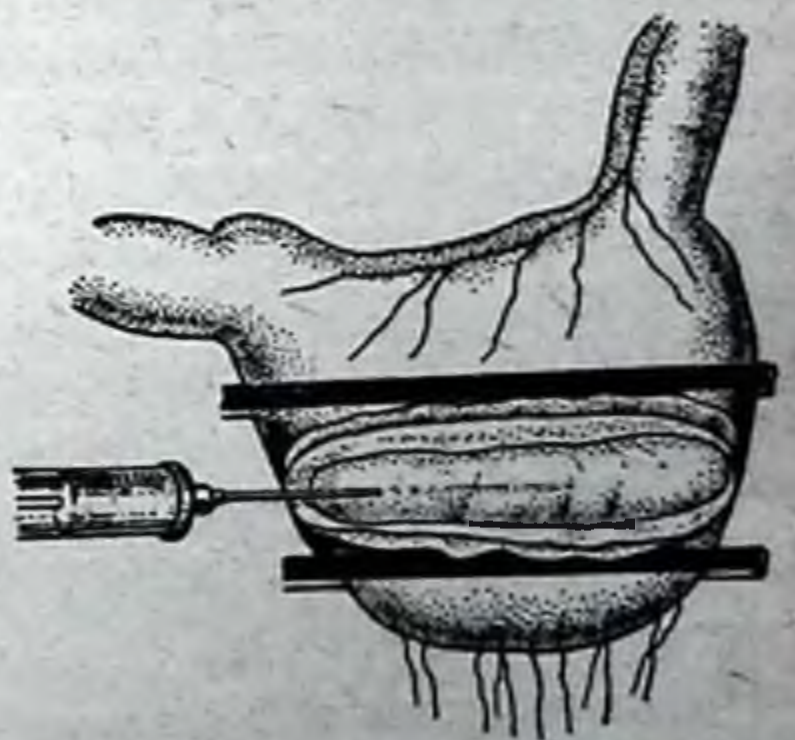


Рис. 167. Введение физиологического раствора под слизистую заднюю стенку желудка (объяснение см. в тексте)

реза должны быть ровными. При этом в разрез «вылезает» слизистая оболочка; крупные сосуды слизистой перевязать с двух сторон. Разрезать ножницами слизистую оболочку передней стенки, под желудок положить несколько слоев марлевых салфеток¹. Тампонами, смоченными в растворе сулемы, тщательно протереть все участки слизистой оболочки.

6. Ввести иглу шприца в среднюю часть складки слизистой оболочки задней стенки желудка, где предполагают сделать разрез.

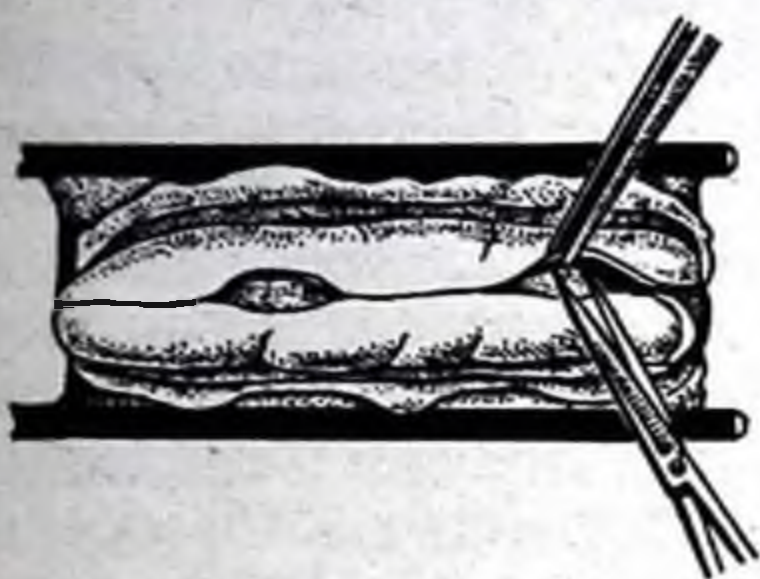


Рис. 168. Отсепаровка подслизистого слоя от мышечного задней стенки желудка

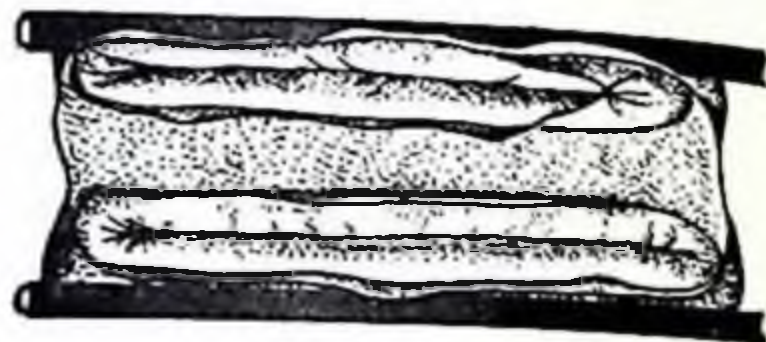


Рис. 169. Формирование сводов

Нагнетать физиологический раствор, иглу передвигать по линии будущего разреза и вводить раствор до тех пор, пока не образуется сплошной валик из вздувшейся слизистой (рис. 167). Произвести по средней линии разрез образовавшегося из слизистой валика. При необходимости ножницами дополнительно отсепаровать слизистую на задней стенке до образования ровной мышечной дорожки шириной в 2 см. Ширина каждой слизистой складки должна быть 1 см (рис. 168).

7. Восстановить целостность обоих желудков: а. С двух сторон каждого желудка сделать своды (всего 4 свода). Формирование сводов делать так же, как в задаче 2 (рис. 169). б. Сшить с помощью длинной нити слизистые оболочки обоих желудков между сводами, учитывая все детали ранее выполненной операции на кошке. Тщательно проверить правильность наложения швов, наложить на выступы слизистой отдельные швы. в. Восстановить с помощью погружного шва целостность передней мышечной стенки желудка (рис. 170). Снять жомы с большого желудка. В случае кровотечения — наложить отдельные швы.

8. Наложить на участок с наименьшим количеством кровеносных сосудов мышечной поверхности малого желудочка два кисетных

¹ При выполнении полостных операций необходимо помнить, что брюшная полость стерильна. Ее загрязнение может привести к серьезному послеоперационному осложнению — перитониту. Поэтому при вскрытии желудка нужно внимательно следить за тем, чтобы его содержимое не попало в брюшную полость; инструменты, которыми производят разрез слизистой оболочки, теряют стерильность и больше в операции не используются. Края слизистой дезинфицируют сулемой, кровь с рук смывают аммиаком.

шва, так, чтобы они образовали два овала (расстояние между швами 1 см). Внутренний диаметр овала должен быть равен диаметру нижнего диска фистульной трубки (рис. 171). Указательным и большим пальцами левой руки хирург зажимает часть желудка, расположенную под кисетными швами и слегка приподнимает руку. В таком положении произвести разрез внутреннего диаметра овала (при этом легче сохранить брюшную полость от загрязнения содержимым малого желудка). Разрез произвести послойно: острым скальпелем разрезать мышечный слой, затем ножницами — слизистую оболочку (рис. 171, А, Б). В оба края разреза ассистент вводит два фистульных крючка и удерживает стенку желудка на весу. Хирург, не разжимая пальцев левой руки, начинает вкручивать фистулу в разрез желудка, зацепив его край вырезкой, на нижнем диске фистульной трубки (рис. 171, В) (в верхнюю часть фистулы плотно вставить пробку). Когда нижний диск фистулы частично вошел в полость желудка, хирург разжимает пальцы, ассистент вынимает крючки и хирург вводит фистулу до конца. Затянуть 1-й кисетный шов, погружая слизистую внутрь, завязать его; участки слизистой, оставшиеся после этой процедуры, подтягивая пинцетом, аккуратно срезать ножницами и смазать иодом. Затянуть 2-й кисетный шов, несколько погружая фистулу в полость желудка, при этом 1-й шов погружается внутрь (рис. 171, Г).

9. Внимательно осмотреть желудок, на кровоточащие места наложить отдельные швы. Во избежание нагноения мышечный шов засыпать белым стрептоцидом. Несколькими стежками прикрепить сальник к стенкам желудка. Осторожно погрузить желудок и селезенку в брюшную полость. Фистульную трубку вывести в центр брюшного отверстия.

10. Восстановить целостность брюшной стенки: а. Непрерывным швом сшить брюшину, подтягивая ее за лигатуры. Начинать шов с одного конца раны и перевязать около фистульной трубки, затем

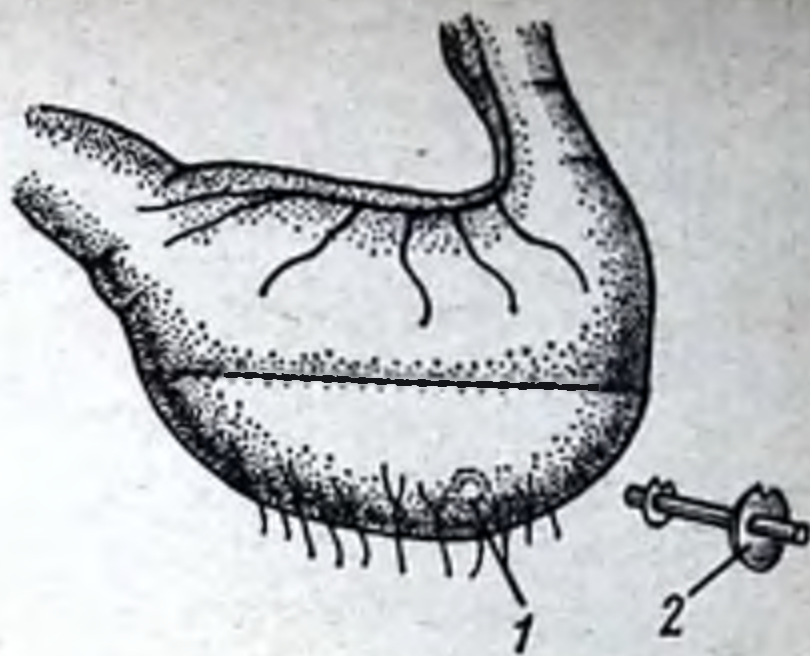


Рис. 170. Вид желудка после наложения общего шва на мышечный слой большого и малого желудков:

1 — место вставления фистулы, 2 — фистула

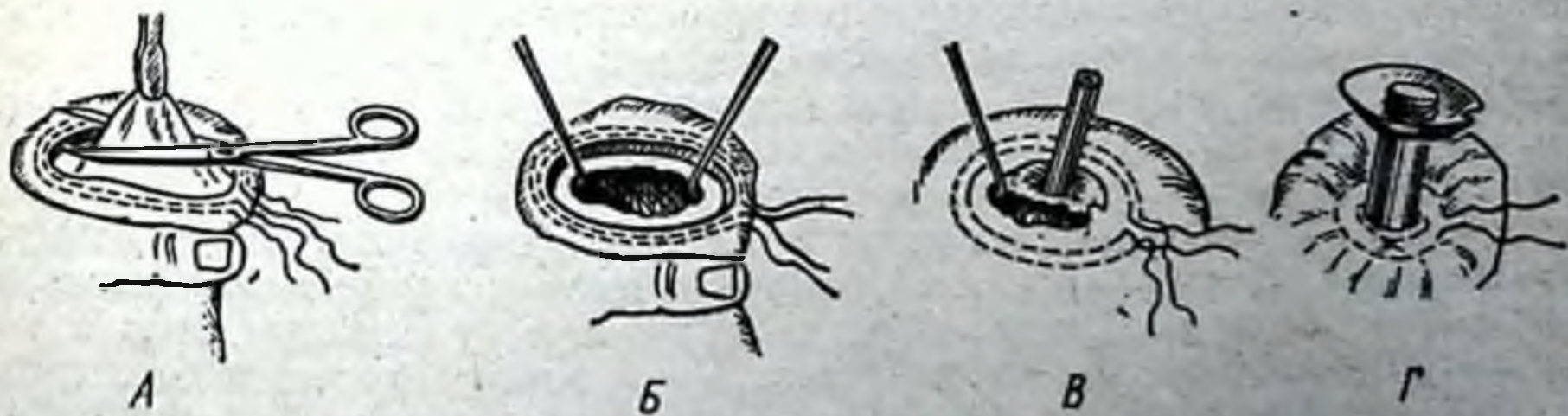


Рис. 171. Вставление фистулы в малый желудочек по Е. Г. Сперанской. А—Г — этапы операции (объяснение см. в тексте)

начать шов с другого конца и снова перевязать у фистульной трубки; следить, чтобы не было зазора. б. Таким же способом послойно сшить мышечные слои. в. Наложить отдельные кожные швы с помощью толстой кожной иглы и прочных ниток; края кожного шва должны быть наружу для лучшего срастания кожи. Каждый шов смазать йодом. Под диск фистулы аккуратно завязать бинт.

11. Собаку осторожно снять со стола, уложить на чистую подстилку на бок, вынуть пробку из фистулы, вставить туда резиновую трубку, свободный конец которой погрузить в ванночку (для оттока накопившейся в малом желудочке желудочного сока, крови и т. д.).

12. В течение 2—3 суток около собаки непрерывно должен находиться дежурный. В течение суток собаке не давать пить, только смачивать язык влажными тампонами. На 2-е сутки несколько раз, прнемногу дать воды. На 3-и сутки два — три раза дать воду с молоком. Затем постепенно добавлять молоко, хлеб и другие пищевые продукты, доводя питание до естественного рациона.

Обработка результатов. Описывают основные этапы операции. Подробно останавливаются на трудных или неудачных ее моментах. Анализируют причины неудач или ошибок. Отмечают различия выполненной модификации и павловской операции, сравнивая их преимущества и недостатки. Высказывают свои соображения, если они возникнут, об улучшении проведенной операции. *Основной отчет о работе — выжившая после операции собака!*

ТЕМА III. ГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поджелудочная железа *gl. pancreas* — важнейший орган пищеварительной системы. В экзокринной части поджелудочной железы вырабатываются ферменты, участвующие в расщеплении основных групп питательных веществ — белков и пептидов, углеводов, жиров, нуклеиновых кислот. В панкреатическом соке обнаружены ферменты, расщепляющие фосфолипидные структуры клеточных мембран.

Поджелудочная железа имеет дольчатое строение благодаря прослойкам соединительной ткани, разделяющим железу на отдельные группы клеток — *ацинусы*. В этих прослойках проходят выводные протоки, междольковые артерии и сопровождающие их вены, лимфатические сосуды, а также пучки нервных волокон. Между соседними ацинарными клетками находятся межклеточные каналы, куда изливается часть секрета. Каналы открываются в полость ацинусов, переходящую во вставочные протоки. Последние переходят в междольковые и главные протоки.

Механизм секреции поджелудочного сока включает два процесса: *синтез и секрецию ферментов и секрецию жидкой части поджелудочного сока*. В этих процессах участвуют ацинарные клетки и клетки проксимальных отделов внутридольковых протоков. Дистальные отделы внутридольковых протоков выполняют большую роль в процессах реабсорбции.

Секреторная функция поджелудочной железы регулируется нервным и гуморальным путем. Нервная регуляция осуществляется при участии блуждающего и симпатического нервов. Гуморальные факторы играют ведущую роль в процессах панкреатического секреторного выделения. К их числу относятся два гормона — *секретин* и *панкреозимин*. Они образуются в специальных эндокринных структурах, расположенных в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки. Под влиянием соляной кислоты желудочного сока, которым пропитан поступа-

ющий из желудка в кишечник пищевой комок, секретин и панкреозимин поступают в кровь и стимулируют секрецию поджелудочного сока гуморальным путем. Такой способ возбуждения панкреатической секреции является основным, но не единственным при действии соляной кислоты на слизистую кишечника. Вторым способом заключается в том, что под влиянием соляной кислоты происходит возбуждение рецепторных образований, расположенных в стенке кишечника, которые рефлекторным путем (главным образом через местные рефлекторные дуги) стимулируют поджелудочное сокоотделение.

При раздражении блуждающего нерва, а также при введении панкреозимина в кровь выделяется небольшое количество панкреатического сока, богатого ферментами. При действии секретина наблюдается обильное выделение сока с высокой концентрацией бикарбонатов и низкой ферментативной активностью. При возбуждении поджелудочной секреции с помощью соляной кислоты характер сокоотделения и его ферментный состав зависят от соотношения нервных и гуморальных факторов в механизме кислотного возбуждения железы.

Функциональное состояние поджелудочной железы может быть охарактеризовано с помощью различных методов исследования; наиболее важными из них для оценки секреторной функции поджелудочной железы являются методы исследования поджелудочного сока. И. П. Павловым была разработана операция для исследования функции поджелудочной железы в хроническом эксперименте, однако при этом происходила хроническая потеря поджелудочного сока.

В настоящее время распространенным приемом получения чистого поджелудочного сока является канюляция главного панкреатического протока. Этот прием широко используют для исследования секреторной функции поджелудочной железы в условиях острого опыта у собаки.

Цель работы. Овладеть операцией введения канюли в проток поджелудочной железы кошки. Установить соотношение нервного и гуморального (секретинового) факторов в механизме возбуждения поджелудочной секреции при введении соляной кислоты в двенадцатиперстную кишку в условиях острого опыта на кошке.

Задача 1. Роль нервных и гуморальных факторов в механизме кислотного возбуждения поджелудочной железы

Методика. Используют хирургические инструменты те же, что в задаче темы 1. Дополнительно готовят зонд с оплавленным концом диаметром 0,3 мм для протока поджелудочной железы; градуированную канюлю для протока; кишечную иглу; иглодержатель; марлевые салфетки; ватные тампоны; шприц на 5 мл; физиологический раствор; 0,4%-ный раствор соляной кислоты.

Регистрацию отделения поджелудочного сока проводят либо с помощью регистрационной системы, используемой при регистрации слюноотделения (см. задачу темы 1), либо с помощью градуированной канюли. Поскольку работа регистрирующей системы была уже описана, в настоящей задаче будет описан второй способ регистрации поджелудочного сокоотделения. Операцию проводят на крупных, среднеупитанных животных. Подготовку к операции проводят, как в задаче темы 1. За день до операции готовят раствор секретина следующим образом. У кошки, уже использованной в остром опыте, вырезают и разрезают вдоль двенадцатиперстную кишку с прилегающим тонким кишечником (15—20 см), промывают

под водопроводной струей. Делают соскоб слизистой оболочки скальпелем, помещают его в фарфоровую ступку и тщательно растирают с кварцевым песком. В ступку доливают 20—30 мл 0,4%-ной HCl и хорошо перемешивают. Переливают полученную кашицу из ступки в большую воронку со складчатым фильтром и ставят фильтровать на длительное время. Отфильтрованный и вывор нейтрализуют 0,1 н. раствором NaOH. Нейтрализованный отфильтрованный раствор кипятят и снова фильтруют в горячем состоянии. Приготовленный секретин может храниться не более суток в темной посуде.

Перед операцией на отдельном столе готовят необходимые инструменты и материалы; делают и проверяют полиэтиленовую канюлю. В отличие от канюли, используемой при регистрации слюноотделения, диаметр канюли 5—7 мм, длина оттянутого кончика 3—4 мм, внешний диаметр кончика примерно 1,5 мм. Канюлю градуируют при помощи шприца, делая соответствующие отметки стеклогграфом.

Операция. 1. После предварительного наркоза кошку укрепить на операционном столе так же, как при выполнении задач предыдущей темы.

2. Тщательно проверить глубину наркоза по отсутствию зрачкового рефлекса и низкому тону брюшных мышц.

3. Подготовить операционное поле: в области средней линии живота на 3 см выше и на 5—6 см ниже мечевидного отростка ножницами осторожно срезать шерсть так, чтобы ширина подготовленного участка была примерно 8—9 см. Ватными тампонами протереть операционное поле сначала спиртом, затем иодом.

4. Строго по средней линии живота, отступя 1 см от мечевидного отростка, скальпелем разрезать кожу на расстоянии 4—5 см (до пупочного узла). Тупым концом скальпеля слегка отсепаровать кожу в обе стороны. По белой линии разрезать мышечную стенку. Для этого в средней части будущего разреза мышцу приподнять пинцетом и сделать небольшой разрез скальпелем. В образовавшееся отверстие ввести указательный палец и под его контролем ножницами расширить разрез в обе стороны до границ кожного разреза. К краям разреза с двух сторон пришить марлевые салфетки.

5. Осторожно извлечь из полости двенадцатиперстную кишку с поджелудочной железой и поместить на салфетки, смоченные теплым физиологическим раствором. В течение всего периода работы внимательно следить за состоянием железы — поддерживать ее во влажном состоянии с помощью салфеток, смоченных подогретым физиологическим раствором.

6. Найти главный, основной проток железы.

В железе есть два протока. Основной проток образуется в результате слияния протоков, собирающих панкреатический сок с обеих половин железы; вместе с общим желчным протоком он впадает в двенадцатиперстную кишку, примерно в 3 см от ее начала. Добавочный проток открывается примерно в 2 см каудальнее основного, иногда он отсутствует. На кишке хорошо видно

овальное утолщение, которое образуется в результате впадения в кишку желчного протока и главного протока поджелудочной железы. Рядом с утолщением, несколько ниже (на 1—1,5 мм), виден главный проток поджелудочной железы в виде прозрачного тяжа — его ход на железе хорошо прослеживается при подсвечивании. Освещение при этом нужно расположить за кишкой, приподняв кишку вместе с железой (рис. 172).

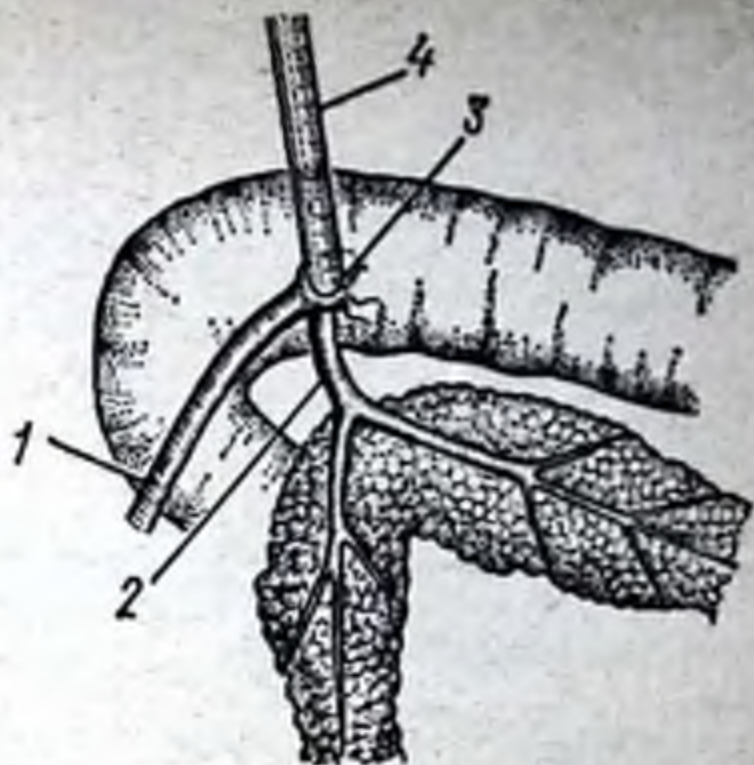


Рис. 172. Поджелудочная железа и ее протоки:

1 — желчный проток, 2 — проток поджелудочной железы, 3 — место вставления канюли (4) в главный проток

7. На кишке, там где проток хорошо виден, сделать надрез острыми глазными ножницами на протоке по направлению к железе и тотчас вставить зонд. Если зонд действительно вошел в проток, он свободно, беспрепятственно проходит до конца протока. Не вынимая зонда из протока, прошить стенку кишки вокруг него, затем вынуть зонд и вставить в проток канюлю.

Канюлю надежно завязать и укрепить в таком положении, чтобы она являлась продолжением протока. Сразу после введения канюли в ней появляется небольшое количество прозрачного поджелудочного сока. Это свидетельствует о том, что канюля правильно вставлена в проток. Иногда спонтанной секреции не наблюдается. В этом случае в двенадцатиперстную кишку с помощью толстой иглы и шприца ввести 4—5 мл раствора HCl . Сделать это так: на расстоянии 15—20 см от желудка пережать кишечник зажимом Пеана. Иглу шприца ввести в просвет кишки на расстоянии 1—2 см от места ее отхождения от желудка. Снять зажим через 5—6 мин. При правильном введении канюли в проток через 3—5 мин после введения раствора HCl в канюле появляется поджелудочный сок. Отсутствие сока в канюле при введении кислоты указывает на то, что канюля введена мимо протока. В этом случае ее надо вынуть, предварительно осторожно срезав закрепляющую нитку, и попытаться вставить вновь. Опыт начинать только после того, как канюля правильно введена в проток¹.

8. Отпрепарировать бедренную вену (рис. 208) и вставить в нее канюлю. На канюлю надеть резиновую трубку, конец которой пережат зажимом. Исследуемые вещества вводить в вену шприцем через эту трубку.

9. Отразить все результаты в протоколе, заполняемом по следующей форме.

¹ Проток поджелудочной железы не всегда хорошо просматривается на кишке. В этом случае можно сделать надрез на утолщении, которое является местом впадения желчного протока и главного протока поджелудочной железы в двенадцатиперстную кишку. Зонд, вставленный в этот надрез, повернуть под углом в 45° и ввести в проток поджелудочной железы.

Параметры изучения	Поджелудочное соковыделение в ответ на введение			
	0,4 %-ной HCl в двенадцатиперстную кишку	секретина в кровоток	0,4 %-ной HCl в двенадцатиперстную кишку на фоне атропина	секретина в кровоток на фоне атропина
Время введения вещества				
Латентный период				
Время отсасывания сока из канюли				
Количество сока, мл				

Опыт 1. Регистрация отделения поджелудочного сока при введении HCl в двенадцатиперстную кишку

Ход работы. 1. Ввести в двенадцатиперстную кишку шприцем 4—5 мл HCl, предварительно подогретой до температуры тела животного.

2. Вести наблюдение за количеством отделяемого поджелудочного сока, отметить латентный период сокоотделения, количество выделившегося сока. Измерения проводить каждые 3 мин в течение 15 мин.

3. Через 15 мин снова ввести 4—5 HCl. Записать те же наблюдения, что при 1-м введении.

Опыт 2. Регистрация отделения поджелудочного сока в ответ на введение секретина в кровяное русло

Ход работы. 1. Ввести в бедренную вену 1 мл свежеприготовленного секретина.

2. См. пункт 2 опыта 1.

3. Через 15 мин снова ввести в бедренную вену 1 мл секретина. Наблюдения за сокоотделением проводить по той же схеме.

Опыт 3. Регистрация отделения поджелудочного сока при введении HCl в двенадцатиперстную кишку на фоне предварительно введенного атропина

Атропин, выключая М-реактивные структуры мембраны железистых клеток поджелудочной железы, снимает действие на железу блуждающего нерва. Последний является эфферентным путем кислотного рефлекторного возбуждения поджелудочной железы. На фоне атропина объем поджелудочной секреции в ответ на действие HCl снижается. Величина этого снижения определяет вклад нервного механизма в кислотное возбуждение поджелудочной железы (в конкретных условиях данного эксперимента).

1. После полного прекращения поджелудочного сокоотделения в ответ на введение секретина ввести в бедренную вену 1 мл 0,1%-ного атропина.

2. Через 3 мин ввести в двенадцатиперстную кишку 4—5 мл НСІ. Наблюдать сокоотделение по описанной выше схеме.

3. Через 15 мин снова ввести то же количество кислоты. Записать те же наблюдения.

Опыт 4. Регистрация отделения поджелудочного сока в ответ на введение секретина в кровь на фоне предварительно введенного атропина

Ход работы. 1. После полного прекращения секреции в ответ на НСІ ввести в бедренную вену 1 мл секретина. Проводить наблюдения за сокоотделением по прежней схеме.

2. Через 15 мин снова ввести в бедренную вену 1 мл секретина. Проводить наблюдения по той же схеме.

Обработка результатов. Анализируют и сравнивают все результаты, полученные при выполнении задачи. Определяют среднее количество сока, выделившегося за 3-минутные интервалы, и общую величину секреции за 15 мин. Представляют цифровые данные в общей таблице. Обращают внимание на различный латентный период сокоотделения при введении НСІ в двенадцатиперстную кишку и секретина непосредственно в ток крови. Сравнивают количество отделяемого сока на НСІ и на секретин до и после введения атропина. Объясняют уменьшение количества отделяемого сока на введение НСІ в кишечник после предварительного введения атропина. Объясняют отсутствие изменений в количестве поджелудочного сока в ответ на действие секретина до и после введения атропина. Делают выводы о роли нервных и гуморальных факторов в механизме сокоотделения поджелудочной железы в ответ на введение НСІ в кишку (в конкретных условиях данного эксперимента).

ТЕМА IV. ОПЕРАЦИЯ ВЫВЕДЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ОТРЕЗКА ТОНКОЙ КИШКИ ПО МЕТОДУ ТИРИ-ВЕЛЛА

В двенадцатиперстной и тонкой кишках происходит интенсивный гидролиз пищевых веществ под влиянием ряда протеолитических, амилалитических и липолитических ферментов. Гидролитические процессы завершаются в кишечнике мембранным пищеварением и всасыванием.

Секреторную и моторную функции кишечника исследуют в острых и хронических опытах на различных животных. Наиболее распространен метод образования изолированного отрезка кишки по методу Тири-Велла у собак. Принцип операции заключается в следующем: вырезают участок кишки (с сохранением ее кровоснабжения и иннервации) и один или два конца выводят наружу, целостность основного кишечника восстанавливается. На такой хронически оперированной собаке исследуют основные закономерности секреторной и двигательной активности изолированной части кишки. В острых опытах изучают влияния на секрецию электрического раздражения нервов или гуморальных факторов.

Для изучения физиологии кишечного пищеварения широко используются методы введения одной или нескольких фистул в интактный кишечник. С помощью специальных приспособлений химус во время опыта выводится через отверстие фистулы наружу, в остальное время — двигается в обычном направлении по кишечнику.

Как и во всех задачах этого раздела, описан вариант операции, разработанный на кошке; освоив ее, студенты могут выполнить стерильную операцию на собаке.

Цель работы. Ознакомиться с приемами операций на кишечнике. Освоить метод наложения энтеро-энтеростомоза и формирования кишечной культи.

Задача. Операция выведения изолированного отрезка тонкой кишки по методу Тири-Велла на кошке

Методика. Подготовка к операции. Всю подготовительную часть операции проводят так же, как в задаче I темы II. Набор инструментов и материалы те же, количество жомов увеличивают до 6. Знакомятся с описанными операциями на кишечнике (см. 23 и 38 в списке литературы). При операции особое внимание обращают на перевязку сосудов: эта операция «кровавая», связана с пересечением многих сосудов, но перевязка большого числа сосудов может привести к развитию местного отека, что сильно затруднит проведение операции (у кошки этот отек развивается значительно медленнее, чем у собак). При проведении операции часть сосудов перевязывают, а там, где это возможно, пережимают жомами.

Проведение операции. Опыт проводят на крупных, среднеупитанных кошках. Подготовку животного к опыту, его наркотизацию, фиксацию на операционном столе, операцию трахеотомии, вскрытие брюшной полости проводят, как в задачах темы II и III.

Ход работы. 1. После вскрытия брюшной полости извлечь двенадцатиперстную кишку и начальную часть тонкого кишечника (длиной около 15 см) и поместить на влажные салфетки.

2. Перед резекцией выбранного участка кишечника тщательно перевязать кровеносные сосуды в местах будущего пересечения кишечника (рис. 173).

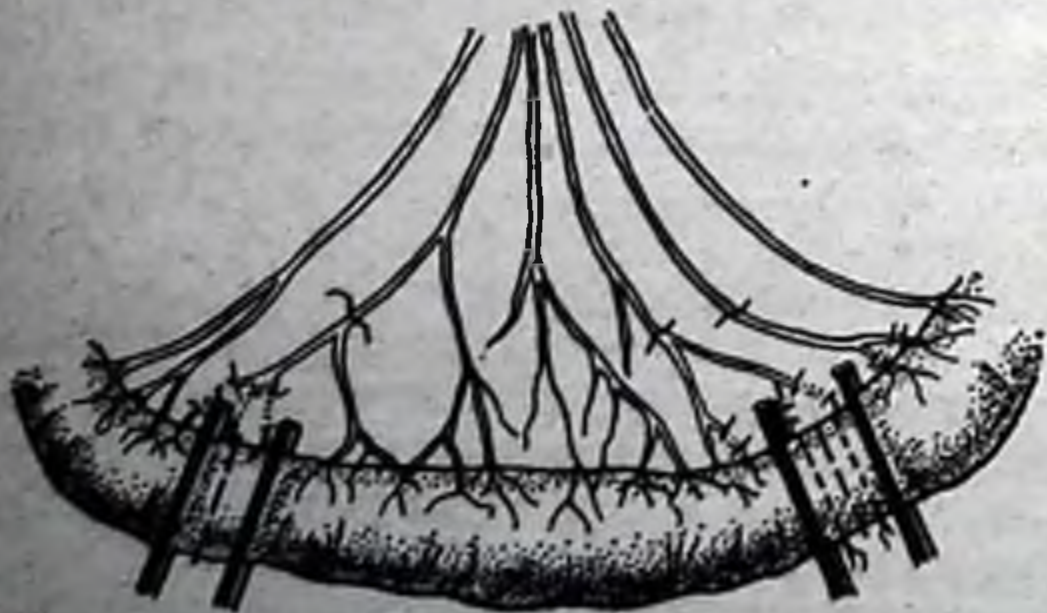


Рис. 173. Перевязка кровеносных сосудов и наложение жомов на кишку в местах будущего ее рассечения

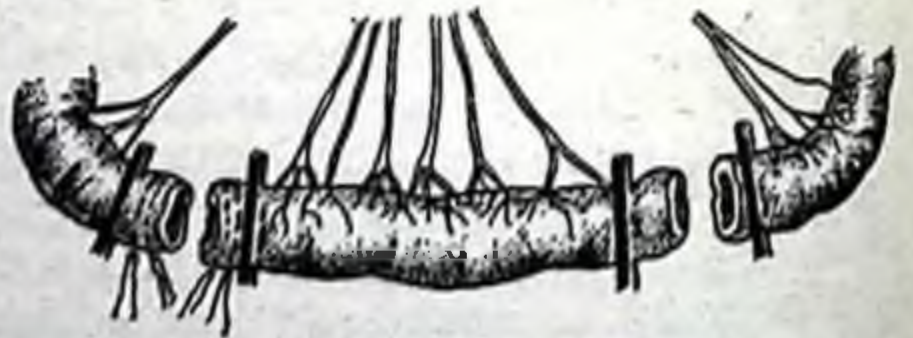


Рис. 174. Наложение серозно-мышечных швов на оральный и аборальный концы кишечника

3. На оральный и аборальный концы участка наложить по два жома. На оральном конце между жомами наложить 4 кисетных шва, так чтобы расстояние между внутренними кисетными швами составляло примерно 1 см. На аборальном участке наложить в шахматном порядке два кисетных шва. Швы накладывать с помощью круглой иглы и плотной нитки. Прошивать мышечные слои и подслизистую (в условиях хронической операции прошивать через слизистую нельзя — это нарушает ее стерильность).

4. Разрезать кишечник между кисетными швами на оральном участке и кисетными швами и жомом на аборальном конце. Под место разреза подложить марлевые салфетки, чтобы содержимое кишечника не попало в полость (рис. 174).

5. Окутать изолированную петлю кишечника влажной салфеткой и, не снимая жомов, осторожно отвести в сторону.

6. На концах основного кишечника сформировать культю; затянуть и завязать двойным узлом сначала концы ближнего к краю кисетного шва, следя за тем, чтобы слизистая погружалась внутрь. Затем затянуть и завязать концы 2-го шва, нажимая пинцетом на культю, при этом ранее наложенный шов погрузится в просвет кишки. После затягивания кисетных швов снять жома в соответствующем конце кишки (рис. 175).

7¹. Для соединения концов основного кишечника наложить их один на другой на расстоянии 4—5 см. «Карманы», образуемые слепыми концами кишки, должны быть не слишком большими, иначе застой кишечного содержимого грозит отравлением организма продуктами гнилостного распада.

8. Наложить жом для избежания кровотечения при дальнейшей операции вдоль места соединения культей кишки. Соприкасающиеся поверхности кишок сшить непрерывным мышечным швом — 1-й шов (рис. 176, б).

9. Параллельно этому шву в обеих частях кишки сделать по разрезу одинаковой длины — около 1,5 см. Это «окно» соединит оба участка основного кишечника. Разрез делается скальпелем послойно, сначала мышечный, потом — слизистой оболочки. Если на слизистой видны крупные сосуды, перевязать их с двух сторон и перерезать (рис. 176, в).

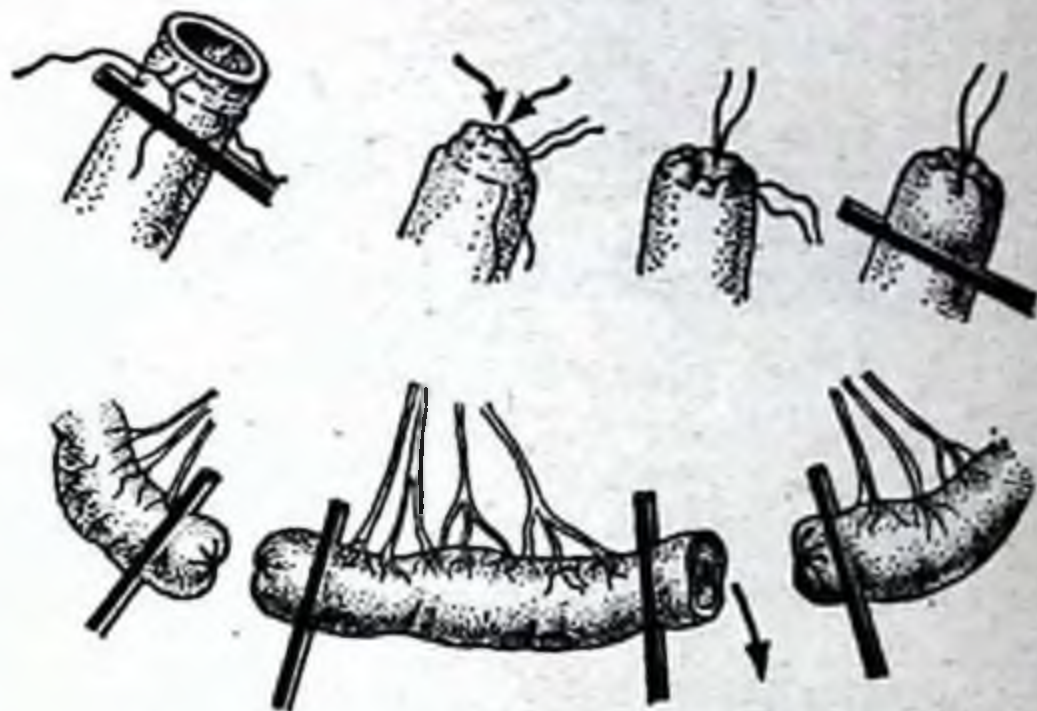


Рис. 175. Формирование культей (объяснение см. в тексте)

¹ Существует два способа восстановления целостности кишки: оба конца кишки могут быть соединены конец в конец или соустье может быть сделано продольно. Мы описываем 2-й способ восстановления кишечника.

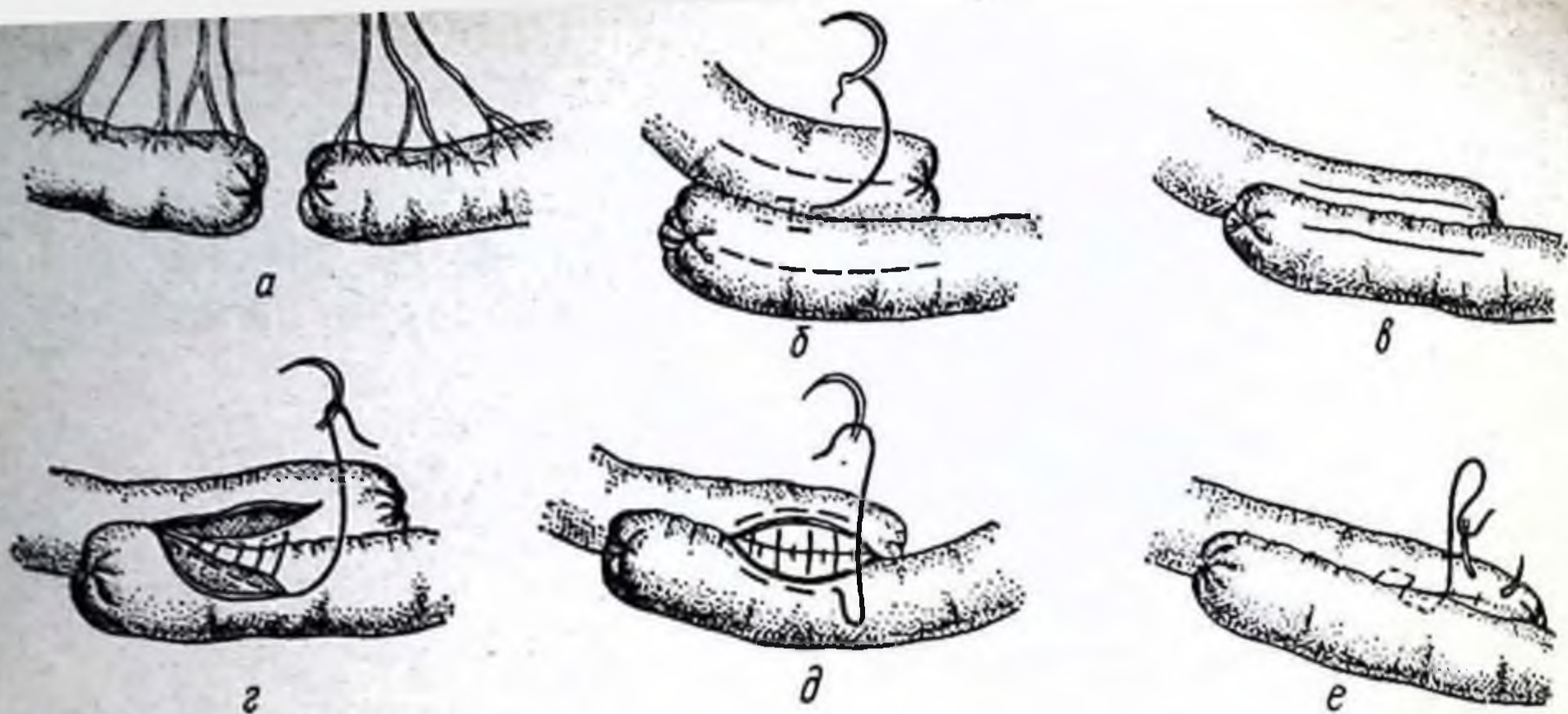


Рис. 176. Восстановление целостности кишечника:
 а — два участка основного кишечника, б — наложение 1-го шва, в — разрезы для образования «окошка» — соустья, г, д, е — наложение 2-го, 3-го и 4-го швов соответственно (объяснение см. в тексте)

10. Поочередно, непрерывным швом, идущим через все слои кишки, наложить 2-й шов, соединяющий внутренние концы разреза, и аналогичный 3-й шов, соединяющий наружные края разреза; 4-й шов соединит наружные мышечные слои. Концы всех четырех лигатур взять на зажимы Пеана. После наложения 4-го шва связать концы 2-го и 3-го и 1-го и 4-го швов, что обеспечит закрытие всех возможных «зазоров» (рис. 176, г, д, е).

11. Окутать область соустья куском сальника, зафиксировать его одним-двумя стежками узловатого шва и погрузить сшитую кишку в брюшную полость.

12. На оральном конце изолированного участка кишки сформировать культю, второй аборальный конец вывести в разрез брюшной стенки (если вывести оральный конец, изолированный участок при перистальтике будет засасываться внутрь).

13. Выведение части кишки производить следующим образом: подвести конец кишки к углу или центру раны и сшить при послойном восстановлении целостности брюшной стенки с мышечным слоем и кожей. При таком способе выведения наружу выводится участок кишечной петли длиной 0,5 см. Можно на наружном конце петли укрепить фистулу. Для этого на мышечный слой выведенного участка кишки наложить два кисетных шва. Ввести фистулу (ее наружный конец закрыть пробкой) и поочередно затягивать и завязывать двойным узлом кисетные швы, начиная с более близкого к краю разреза. Слизистую погрузить внутрь. Кожу сшить, как описано в предыдущей задаче.

Обработка результатов. Отчетным документом по задаче является протокол операции. В протоколе должны быть отмечены основные этапы операции, все трудные или неудачные моменты операции с анализом их причин.

Рекомендуемая литература: [3]; [23]; [26]; [38]; [41]; [42]; [43]; [49].

Раздел VII

ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

Эндокринология — наука о функциях эндокринных желез и гормональной регуляции основных процессов жизнедеятельности организма человека и животных. Эндокринные железы, или железы внутренней секреции, представляют собой специализированные структуры животного организма, в которых образуются специфические продукты — *гормоны*. Гормоны, секретирясь железами в кровь, оказывают гуморальное системное регуляторное влияние на различные метаболические процессы в клетках. Таким образом, *основными объектами* исследования эндокринологии являются система эндокринных желез, гормоны и механизмы гормональной регуляции деятельности органов, тканей и клеток.

Эндокринная система представлена в организме не только совокупностью желез внутренней секреции и секретируемых ими гормонов. Каждая эндокринная функция (функция гипофиза, гонад, надпочечников, щитовидной железы и т. д.) является сложноорганизованной, многокомпонентной системой разнородных, но взаимосвязанных и тонко сбалансированных процессов. Основными из них являются:

биосинтез и секреция гормонов железами; специфическая нервная и гуморальная регуляция и саморегуляция этих процессов; специальный транспорт гормонов в крови, включающий образование комплексов гормонов с транспортными белками; специфическая рецепция гормонов клетками, осуществляемая особыми клеточными белками — циторецепторами; ферментативные метаболические превращения гормонов на периферии (активация, инактивация). В осуществлении данных процессов кроме самой эндокринной железы принимают непосредственное участие другие органы и физиологические системы: ЦНС, другие эндокринные железы, печень, почки, реагирующие на гормоны (компетентные) клетки. Только сбалансированная организация всех компонентов внутри эндокринных функций, а также взаимодействие между отдельными функциями могут обеспечить координированный гормональный контроль жизнедеятельности клеток в целом организме. Изучая различные компоненты эндокринных функций, эндокринология является наукой комплексной, включающей в свой методический арсенал разнообразные методы: морфологические, физиологические, биохимические, радиоиммунологические и некоторые другие.

Поскольку изучение физиологии эндокринной системы всегда так или иначе связано с количественным определением низких концентраций (10^{-6} — 10^{-10} моль/л) гормонов и их метаболитов в железах, крови и периферических тканях, биохимические и некоторые радиобиологические методы количественного анализа гормональных соединений приобретают особое значение. Среди биохимических методов, широко используемых для количественного определения гормонов в биологическом материале, необходимо отметить фотометрические и флуориметрические методы, методы сатурационного (радиолигандного) анализа. Методы количественного анализа гормональных соединений часто сочетаются с предварительной очисткой и разделением соединений с помощью разных вариантов хроматографии — тонкослойной, бумажной и колоночной.

При выборе метода определения гормонов и анализе получаемых с его помощью данных необходимо оценивать возможности используемого метода по следующим критериям: *специфичности* (избирательности качественной реакции); *чувствительности* (минимальному достоверно определяемому количеству определяемого вещества); *точности* (достоверно определяемой разности соседних точек на калибровочной кривой); *воспроизводимости* (степени совпадаемости результатов определения вещества в параллельных пробах в течение одного опы-

та и в разных опытах); *открываемости вещества* (характеристика, обратная потерям вещества при анализе); *производительности* (возможному количеству одновременно исследуемых проб и продолжительности их анализа). Очевидно, что чем более специфичен, чувствителен, точен, воспроизводим и удобен для метод, чем полнее определяется вещество, тем более он пригоден и удобен для количественного анализа гормонов. В настоящее время наиболее широкое применение для определения гормонов находит радиоиммунологический анализ, в наибольшей степени соответствующий перечисленным выше требованиям.

Все приведенные замечания по поводу объектов и методов эндокринологического исследования должны постоянно учитываться в практике экспериментальных исследований в области физиологии эндокринной системы.

Настоящий раздел содержит 12 экспериментальных задач по трем темам. Задачи предполагают изучение студентами важнейших подходов и методов современной эндокринологии. В частности, сюда входят методы определения гормонов в биологических жидкостях на основе фотометрического, флуориметрического, хроматографического и сатурационного анализов, методы измерения комплексирования гормонов с транспортными белками, принципы и техника морфологического и физиологического изучения функционального состояния эндокринных органов.

ТЕМА I. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛЕЗ ВНУТРЕННЕЙ СЕКРЕЦИИ

Цель работы. Получить наглядное представление об анатомии и гистологическом строении основных желез внутренней секреции млекопитающих. Освоить методы хирургического удаления ряда эндокринных желез: гонад, надпочечников, гипофиза. Изучить влияние удаления желез через определенные сроки после операции на зависимые функции организма. Исследовать влияние кастрации на массу матки и состояние полового цикла у самки и на массу добавочных половых желез у самца крысы. Изучить влияние гипофизэктомии на функциональное состояние некоторых органов-мишеней.

Задача 1. Топография и анатомическая характеристика желез внутренней секреции крысы (вскрытие самца и самки крысы)

Оборудование: ванночка, залитая воском; ножницы большие и глазные; 2 пинцета; иглы препаровальные; тетрадь; цветные карандаши.

Ход работы (рис. 177). Щитовидная железа. 1. Разрезав кожу на шее, обнаружить крупные слюнные железы и расположенные ближе к голове лимфатические узлы. Раздвинув их, найти вентральные мышцы шеи.

2. Осторожно разделить по средней линии грудинно-подъязычные мышцы и обнаружить под ними трахею. По бокам трахеи на уровне 4—5 колец под щитовидным хрящом находится щитовидная железа, состоящая из двух долей. Доли соединены между собой тонким перешейком. Средняя масса щитовидной железы крысы 15—20 мг.

Околощитовидная (паращитовидная) железа. Крысы, как правило, имеют только одну пару желез, расположенных под капсу-

лой щитовидной железы в толще последней, в виде светлых округлых пятнышек на фоне красной ткани щитовидной железы. Число и расположение околощитовидных желез неодинаковы у разных позвоночных.

Поджелудочная железа.

1. Вскрыть полость тела. 2. Поджелудочная железа лежит позади желудка, под двенадцатиперстной кишкой. Это сложно-трубчатое образование плоской формы красновато-серого цвета. Поджелудочная железа очень рыхлая и состоит из множества отдельных долек. Выводные протоки экзокринной части железы впадают в общий желчный проток и уже вместе с ним в двенадцатиперстную кишку. Все элементы железы — эндокринная и экзокринная части, сосуды и протоки густо оплетены нервами, в самой ткани железы имеются скопления нервных ганглиев. В поджелудочной железе различают головку, тело и хвост (селезеночный отдел).

Надпочечники. Это парный орган, располагается близ верхнего полюса почек в жировой капсуле и представляет собой плотные образования округлой формы. Надпочечники состоят из двух эндокринных желез: *коры надпочечников*, представляющей собой интерренальную ткань, которая вырабатывает стероидные гормоны, и *мозгового слоя*, состоящего из хромаффинной ткани, которая вырабатывает катехоламины. Коровый и мозговой слои хорошо различимы визуально на разрезе надпочечника. Средняя масса надпочечника крысы 40—50 мг.

Половой аппарат самца. Основная половая железа взрослого самца — *семенники*, расположенные в мошонке. Добавочные (акцессорные) половые железы — *предстательная железа (простата)*, *семенные пузырьки*. Опылительным местом при вскрытии может служить мочевой пузырь: выше него расположены семенные пузырьки, имеющие вид двух крупных вытянутых образований, заполненных густым секретом. Под мочевым пузырем и несколько ниже расположена простата, состоящая из вентральных и дорсальных долей. Кроме того, к добавочным половым железам относятся бульбо-уретральные (куперовы) железы, расположенные у основания полового члена, и препуциальные железы, маленькие образования, прилегающие к головке полового члена. Чтобы одновре-

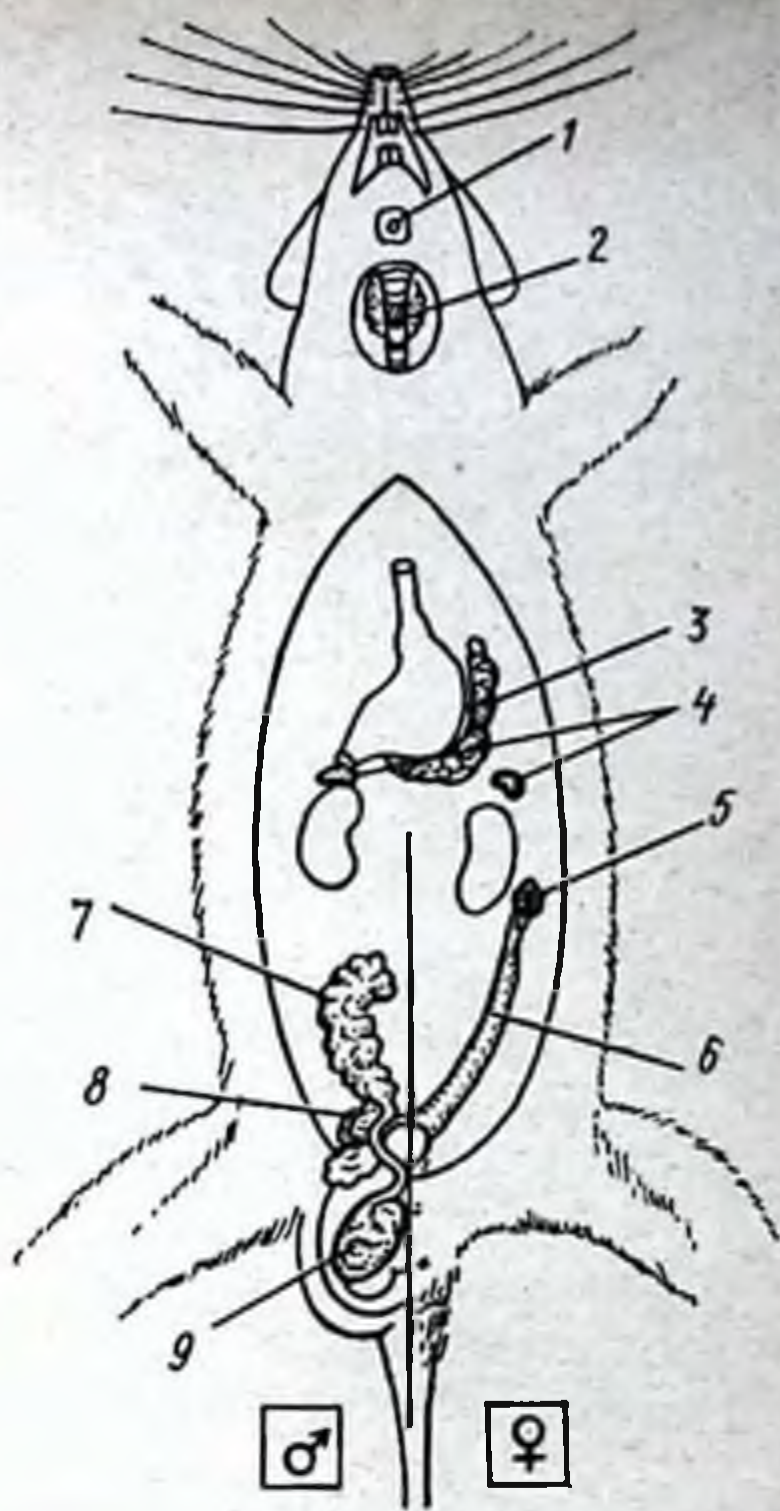


Рис. 177. Эндокринные железы крысы:

1 — гипофиз, 2 — щитовидная железа, 3 — поджелудочная железа, 4 — надпочечники, 5 — яичник, 6 — рог матки, 7 — семенной пузырек, 8 — простата, 9 — семенник

менно видеть все части половой системы, можно, нажимая на мошонку, переместить в брюшную полость семенники с их придатками (эпидидимис). От семенников к месту соединения семенных пузырьков и простаты подходят семяпроводы. Средняя масса семенников крысы 2,5—3 г.

Половой аппарат самки. Яичники расположены у нижнего полюса почки. Это небольшие округлые образования с бугристой поверхностью из-за выпячивания крупных желтых тел. Матка у крысы двурогая. Каждый рог кончается яйцеводом с воронкой, расположенной у яичника. Нижняя часть тела матки переходит во влагалище. Средняя масса яичников крысы 50—60 мг.

Гипофиз. Вскрыть черепную коробку. Гипофиз — небольшое уплощенно-овальное образование, находящееся в турецком седле у основания черепа. Он состоит из *передней доли* (железистая, или аденогипофиз), *промежуточной доли* и *задней доли* (нейрогипофиз). Гипофиз соединяется с гипоталамусом ножкой или стеблем. Гипофиз обильно снабжается кровью. Особенностью кровоснабжения передней доли гипофиза является порталная (воротная) система сосудов.

Обработка результатов. Схематично зарисовывают железы внутренней секреции.

Рекомендуемая литература: [11]; [16]; [29].

Задача 2. Гистологическое строение желез внутренней секреции

Оборудование. Микроскоп; готовые препараты эндокринных желез; тетрадь; цветные карандаши.

Описание препаратов. *Щитовидная железа.* Щитовидная железа снаружи покрыта соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходят тонкие прослойки соединительной ткани, делящие железу на дольки. Эти прослойки называются *интерфолликулярной тканью* и содержат кровеносные сосуды. Ткань щитовидной железы состоит из *фолликулов*, образованных одним слоем эпителиальных клеток с круглыми ядрами. Полость фолликулов содержит вязкую массу — коллоид, в котором образуются *тиреоидные гормоны*. Чрезмерно активное состояние железы (*гипертиреоз*) характеризуется высоким эпителием (цилиндрический или кубический) и разжижением коллоида, который бледно окрашен и включает в себя много вакуолей. При *гипотиреозе* фолликулы растягиваются, эпителий уплощается, коллоид становится густым и ярко окрашивается.

Ход работы. Рассмотреть при большом увеличении 10×40 и зарисовать гистологические препараты щитовидной железы крысы при различном функциональном состоянии железы (окраска гематоксилин-эозином).

Яичник. В яичнике различают *корковое* и *мозговое вещество*. В корковом веществе происходит созревание яйцеклеток и осущест-

ствляется продукция женских половых гормонов — эстрогенов и прогестерона. В мозговом слое располагается соединительная ткань, богатая кровеносными сосудами.

Снаружи яичник окружен капсулой, его поверхность покрыта одним слоем кубического эпителия (зачатковый эпителий). Глубже проходит белковая оболочка из волокнистой соединительной ткани с вытянутыми ядрами. Далее в соединительнотканной строме можно видеть фолликулы первичные, или примордиальные, образованные яйцеклеткой, которая окружена одним слоем плоских фолликулярных клеток. Несколько глубже в строме лежат более зрелые компактные фолликулы. В них яйцеклетка крупнее с толстой гомогенной оболочкой. Она окружена несколькими рядами кубических и цилиндрических клеток — *фолликулярной оболочкой*, или *гранулезой*. Вокруг них из ткани стромы образуется тека *фолликула*. Более зрелыми фолликулами являются везикулярные с полостью, заполненной фолликулярной жидкостью. Самые зрелые фолликулы — *граафовы пузырьки*. Это крупные образования с большой яйцеклеткой, находящейся в полости фолликула. Полость окружает несколько рядов фолликулярных клеток. Яйцеклетка находится внутри скопления клеток гранулезы, называемом *яйценосным бугорком*. Тека граафова пузырька состоит из трех слоев: тонкой стекловидной оболочки, примыкающей к гранулезе; богатой сосудами внутренней теки *t. interna*, и плотной, состоящей из соединительной ткани, *t. externa*. Эстрогены вырабатываются главным образом в *t. interna*. Кроме того, на препаратах можно видеть фолликулы, в которых яйцеклетка деформирована, а клетки гранулезы утратили связь и подверглись перерождению. Это так называемые *атретические фолликулы*.

Кроме фолликулов на разных стадиях развития препараты яичника взрослой самки содержат *желтые тела*, состоящие из лютеиновых клеток с зернистой цитоплазмой и округлыми пузырьчатыми ядрами. В лютеиновых клетках образуется гормон желтого тела — *прогестерон*.

Ход работы. Рассмотреть гистологический препарат яичника крысы (окраска гематоксилин-эозином) и зарисовать при малом увеличении микроскопа (10×8) разные стадии созревания яйцеклетки. Зарисовать при большом увеличении (10×40) строение зрелого фолликула и желтого тела.

Семенник. Семенник покрыт плотной соединительнотканной оболочкой. Под ней расположена плохо различимая сосудистая оболочка. Семенник разделен на дольки. Препарат состоит из срезов через извитые семенные каналы. Каждый каналец снаружи окружен тонкой соединительнотканной оболочкой. На срезе канала можно видеть зародышевые клетки на разных стадиях сперматогенеза. В наружном ряду расположены *сперматогонии* — клетки с небольшими богатыми хроматином и интенсивно окрашенными ядрами. Среди них находятся *сертолиевы клетки*, обеспечивающие питание развивающихся половых клеток (у них крупные треугольной формы ядра). Далее вглубь лежит один-два слоя клеток с

крупными ядрами — *сперматоциты I порядка*, еще внутренней — *сперматоциты II порядка* с более мелкими ядрами и сперматиды, имеющие форму овальных или удлинённых клеток. В просвете находятся зрелые *сперматозоиды*, обращённые хвостиками в просвет канальца. Между извитыми канальцами группами или по одиночке в прослойках рыхлой соединительной ткани расположены крупные интерстициальные *клетки Лейдига*, имеющие большое круглое ядро. В клетках Лейдига образуются *андрогены*.

Ход работы. Рассмотреть гистологический препарат семенника крысы при малом увеличении (10×8) и зарисовать участок семенного канальца, содержащего зародышевые клетки на разных стадиях сперматогенеза. Зарисовать интерстициальные клетки Лейдига.

Надпочечники. Надпочечник покрыт снаружи соединительнотканной капсулой, содержащей кровеносные сосуды и нервные ганглии. Под капсулой расположена *кора надпочечника*, состоящая из трех зон. 1. Клубочковая зона *z. glomerulosa*: клеточные тяжи имеют форму петель или клубочков, состоящих из веретеновидных клеток, которые расположены поперек тяжа; имеют овальное ядро. В клубочковой зоне образуется главным образом альдостерон, относящийся к минералокортикоидам, влияющим на минеральный обмен. 2. Пучковая зона *z. fasciculata*: наиболее широкая зона; длинные клеточные тяжи идут радиально, почти параллельно друг другу, они состоят из больших многоугольных клеток с округлым ядром, в цитоплазме которых много липоидных зерен. В пучковой зоне образуются в основном глюкокортикоиды (кортикостерон и гидрокортизон), влияющие на белковый и углеводный обмен. 3. Сетчатая зона *z. reticularis*: сложная сеть тяжей, состоящих из многоугольных клеток. В сетчатой зоне образуются андрогены (андростендион, дегидроэпиандростерон).

Под корой располагается *мозговое вещество* надпочечника, состоящее из широких тяжей. Каждый тяж содержит несколько рядов сравнительно крупных многоугольных клеток с большими ядрами. Между тяжами имеется сеть сильно расширенных кровеносных капилляров. Хромофильные клетки мозгового вещества вырабатывают *адреналин* и *норадреналин*.

Ход работы. Рассмотреть и зарисовать гистологический препарат надпочечника крысы (окраска железным гематоксилином, ув. 10×40).

Поджелудочная железа. Железа разделена на многочисленные дольки прослойками из соединительной ткани. Основную массу железы составляет *зимогенная ткань*, которая образована одним слоем железистых клеток, вырабатывающих панкреатический сок и выводящих его во внутридольковый проток. Внутри железистых долек среди зимогенной ткани расположены светлее окрашенные *островки Лангерганса*. Каждый островок снаружи окружен тонкой прослойкой соединительной ткани. При окраске азаном в островке Лангерганса можно определить два типа секреторных клеток. а-Клетки имеют округлую или многоугольную форму, боль-

шое ядро и содержат в цитоплазме гранулы, окрашенные в ярко-красный цвет.

β -Клетки имеют более или менее призматическую форму, округлое ядро и содержат в цитоплазме гранулы, окрашенные в бледно-голубой цвет. У крысы обычно β -клетки расположены в центральной части островка, α -клетки — по периферии. β -Клетки вырабатывают *инсулин*, а α -клетки — глюкагон. Оба гормона участвуют в регуляции углеводного обмена.

Ход работы. Рассмотреть гистологический препарат поджелудочной железы крысы и зарисовать при большом увеличении (10×40) островок Лангерганса.

Гипофиз. Гипофиз состоит из передней, промежуточной и задней долей. Передняя доля содержит переплетающиеся тяжи и группы эпителиальных клеток, которые по разному отношению к красителям делят на три группы: хромофобные, оксифильные и базофильные. *Хромофобные*, или *главные*, клетки по размерам меньше других, округлой формы, имеют большое светлое ядро, не содержат заметной зернистости, окрашены в бледно-фиолетовый цвет. *Оксифильные*, или *эозинофильные*, клетки содержат в цитоплазме зерна, окрашенные в красный цвет. Среди них различают два типа: *лактогенные ацидофилы*, в которых много крупных оксифильных зерен и *соматотропные ацидофилы*, содержащие мелкие оксифильные зерна в меньшем количестве. *Базофильные* клетки имеют более крупные размеры и содержат в цитоплазме зерна, окрашенные в синий цвет. Среди них различают *тиреотропные базофилы*, имеющие многоугольную форму и небольшое количество мелких базофильных гранул, и *округлые гонадотропные базофилы*, ядро которых имеет неправильную форму, а цитоплазма содержит большое число мелких базофильных гранул.

Промежуточная, или средняя, доля состоит из плотной массы вытянутых эпителиальных клеток. Здесь очень мало соединительнотканых и кровеносных сосудов. Задняя доля содержит большое количество безмякотных нервных волокон. Среди них расположены нейроэпителиальные клетки-питуициты. В прослойках соединительной ткани проходят кровеносные сосуды.

Ход работы. Рассмотреть гистологический препарат гипофиза крысы и зарисовать при большом увеличении (10×40) участок передней доли гипофиза (окраска азаном).

Рекомендуемая литература: [9]; [15].

Задача 3. Роль гонад в регуляции вторичных половых признаков

Наряду с зародышевой функцией семенники и яичники обладают гормональной функцией, вырабатывая стероидные гормоны, стимулирующие развитие и рост органов половой системы, возникновение вторичных половых признаков и осуществление полового поведения. Взаимодействие гормонов гипоталамуса, гипофиза и гонад по принципу обратной связи приводит у самок млекопитающих к циклическим изменениям функции яичников — развитию фолликулов,

овуляции и образованию желтых тел, что, в свою очередь, отражается на тканях матки и стенке влагалища.

Кастрация половозрелых самок приводит к инволюции матки и прекращению полового цикла. У кастрированных самцов наблюдается атрофия добавочных половых желез. Исчезают вторичные половые признаки, изменяются половые рефлексы. Кастрация также влияет на обмен веществ и различные функции организма.

Опыт 1. Определение фаз полового цикла у самок крыс по влагалищному мазку

Половой цикл у самок крыс продолжается 4—5 дней и состоит из 4 фаз: *проэструс* (предтечка), *эструс* (течка), *метаэструс* (послетечка), *диэструс* (межтечка). Каждой фазе полового цикла свойственны определенные изменения матки и влагалища, которые отражаются на влагалищном содержимом.

Оборудование. Микроскоп; предметные стекла; спички; вата.

Ход работы. 1. Брать мазки из влагалища крысы деревянной палочкой (спичкой) с тонко обструганным концом. На конец наматывать небольшое количество ваты, увлажненной водой.

2. Ввести спичку во влагалище, нанести мазок на предметное стекло.

Для каждой фазы эстрального цикла характерны следующие особенности влагалищного мазка. В фазе проэструса мазок состоит из живых эпителиальных клеток овальной или округлой формы с ядром. Стадия эструса характеризуется наличием в мазке крупных ороговевших безъядерных клеток в виде чешуек неправильной формы. Мазок в стадии метаэструса содержит ороговевшие чешуйки, живые эпителиальные клетки и лейкоциты. В фазе диэструса в мазке большое количество лейкоцитов и слизь.

3. Рассмотреть свежие влагалищные мазки крыс под микроскопом при малом увеличении и зарисовать схематично клеточный состав мазка на различных стадиях полового цикла.

Опыт 2. Кастрация самки крысы (овариэктомия)

Оборудование. Операционный столик; тесьма для фиксации животных; эфир; спирт; иод; два пинцета глазных хирургических; пинцет глазной анатомический с изогнутыми концами; ножницы маленькие; скальпель; иглы хирургические; иглодержатель; шелк; вата; бинт широкий стерильный или салфетки.

Ход работы. 1. Произвести кастрацию под легким эфирным наркозом. Фиксировать крысу к столику спиной вверх. Выщипать шерсть в поясничной области. Протереть операционное поле спиртом и смазать иодом.

2. По средней линии спины сделать продольный разрез 1—2 см так, чтобы он начинался приблизительно на 1 см сзади от уровня последней пары ребер. Оттянув край разреза крючком вправо, найти примерно на 1 см латеральнее длинной мышцы спины место, где просвечивает яичник или окружающая его жировая ткань. Сделать в этом месте острым глазным пинцетом прокол мышцы и попасть в брюшную полость. Яичник расположен у нижнего полюса почки.

3. Захватить пинцетом и вытащить через разрез наружу жировую ткань вместе с яичником, яйцеводом и верхней частью рога матки.

4. Наложить лигатуру на верхнюю часть матки и отрезать яичник вместе с яйцеводом.

5. Рог матки погрузить в полость тела.

6. Прodelать ту же процедуру слева. Мышцы не зашивать.

7. Зашить кожу шелком, непрерывным швом и смазать иодом. После операции поместить животное в чистую клетку и содержать при обычных условиях.

Опыт 3. Кастрация самца крысы

Оборудование. См. опыт 2.

Ход работы. 1. Проводить операцию под легким эфирным наркозом. Фиксировать крысу на операционном столике брюшком вверх. Выщипать шерсть на мошонке, кожу протереть спиртом и смазать иодом. У крыс семенники часто бывают втянуты в полость тела: нажатием пальцами на брюшко переместить их в полость мошонки.

2. Скальпелем произвести продольный разрез кожи 1—1,5 см посредине мошонки между семенниками и приступить к удалению одного из семенников.

3. Захватив пинцетом край кожи, отсепарировать кожу мошонки от влагалищной оболочки семенника.

4. Захватив пинцетом влагалищную оболочку семенника, произвести скальпелем небольшой надрез оболочки, через который при надавливании выходит семенник с эпидидимисом и жировой тканью. Перехватить зажимом край влагалищной оболочки, чтобы она не переместилась в полость тела.

5. Наложить лигатуру на семенной канатик и окружающую его влагалищную оболочку, снять зажим. Отрезать ножницами семенной канатик ниже лигатуры и, таким образом, удалить семенник вместе с эпидидимисом и частью семенного канатика.

6. Вправить обратно в мошонку перевязанный конец влагалищной оболочки и через тот же кожный разрез удалить таким же способом 2-й семенник.

7. Наложить непрерывный шов и смазать его иодом. Как правило, операция проходит совершенно бескровно. После операции животное содержат при обычных условиях.

Опыт 4. Посткастрационные изменения у самок и самцов крыс

Оборудование. Аптекарские весы; торсионные весы; ванночки для вскрытия; два пинцета; ножницы большие; ножницы маленькие; эксикатор; эфир.

Ход работы. 1. Забить intactных и ранее кастрированных крыс с помощью эфирного наркоза и определить массу их тела.

2. Взвесить на аптекарских весах матки у интактных самок крыс и крыс через 1,5—2 месяца после овариэктомии.

3. Взвесить на аптекарских и торсионных весах добавочные половые железы (простата и семенные пузырьки) у интактных и кастрированных самцов крыс.

Обработка результатов. Результаты вскрытия помещают в таблицу.

Группа животных	Самки				Самцы			
	номер животного	масса тела	масса матки		номер животного	масса тела	масса простаты и семенных пузырьков	
			мг	мг/100 г массы тела			мг	мг/100 г массы тела
Интактные								
Кастрированные								

Рекомендуемая литература: [11]; [16].

Задача 4. Адреналэктомия крысы

Корковый слой надпочечника является жизненно важным органом. Двусторонняя адреналэктомия неминуемо приводит к смерти, за исключением тех случаев, в которых имеющаяся у некоторых животных добавочная интерреналовая ткань гипертрофируется и в какой-то степени компенсирует недостающие надпочечники. Адреналэктомированные животные могут прожить от нескольких дней до трех недель при соблюдении соответствующих условий содержания. Отсутствие минералокортикоидов сказывается на изменении нормального соотношения ионов K^+ и Na^+ в организме, что приводит к серьезным функциональным нарушениям. Поэтому после адреналэктомии животным необходимо давать пищу, бедную солями K , а вместо воды — 1%-ный раствор $NaCl$. Кроме того, у адреналэктомированных крыс нарушена терморегуляция, поэтому животные должны содержаться при $+25—27^{\circ}C$. Адреналэктомия приводит к нарушению углеводного и белкового обмена, в связи с чем у таких животных наступает резкая мышечная слабость, быстрая утомляемость, снижение устойчивости к инфекциям и интоксикации, тепловым и холодным воздействиям.

Оборудование. См. опыт 2 задачи 3.

Ход работы. 1. Производить операцию под эфирным наркозом. Фиксировать крысу на операционном столике спиной вверх. Выщипать шерсть на участке спины ниже окончаний ребер, протереть кожу спиртом и смазать иодом.

2. Сделать по середине спины продольный разрез кожи на 1—2 см кзади от последней пары ребер. Оттянув край разреза вправо, глазными ножницами сделают небольшой косой разрез мышц в углу, образованном последним ребром и длинной мышцей спины.

3. Расширяя край разреза пинцетами, увидеть почку и сорнировать на ее верхний полюс, где находят надпочечники.
4. Захватить одним пинцетом надпочечник и оторвать его. Кровотечения обычно не бывает.
5. Наложить на разрез мышц один-два шва. Аналогичным способом удалить 2-й надпочечник. Наложить на кожу шелковый непрерывный шов, смазать его иодом.

Задача 5. Гипофизэктомия и ее последствия

Гипофиз — очень важная эндокринная железа, которой в функциональном отношении подчинена деятельность периферических желез: щитовидной, половых и коркового слоя надпочечников. В результате удаления гипофиза происходит

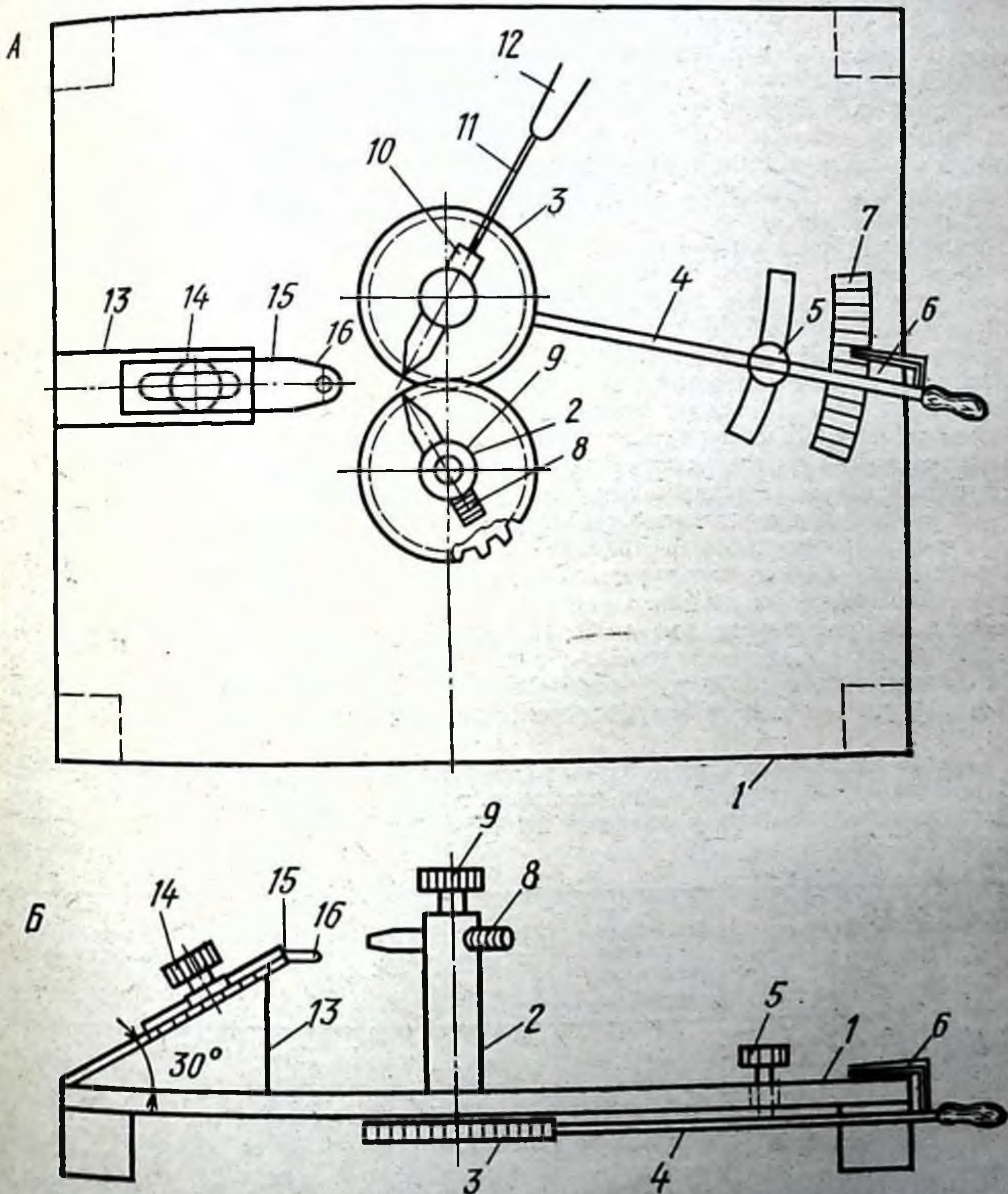


Рис. 178. Вид сверху (А) и сбоку (Б) прибора В. П. Федотова для гипофизэктомии (объяснение см. в тексте)

атрофия указанных желез или резкое ослабление их функций. Кроме того, гипофиз непосредственно участвует в регуляции всех видов обмена веществ, а также в регуляции основных биологических процессов, таких, как рост и размножение.

Опыт 1. Методика трансаурикулярного удаления гипофиза у крысы (на приборе Федотова)

Оборудование. Прибор Федотова (рис. 178); иглы к шприцам «Рекорд» № 1090 1×90 (мм); шприц для промывания иглы; спирт; вата; пинцет глазной хирургический; игла препаровальная.

На панели 1 (рис. 178) из органического стекла или другого материала на равном расстоянии (28 мм) от продольной оси прибора помещены две металлические стойки 2 высотой 65 мм. Нижние части стоек имеют меньший диаметр и свободно вращаются в сквозных отверстиях панели. На выступающие концы стоек с нижней стороны панели впрессованы сцепленные друг с другом зубчатые колеса 3 диаметром 58 мм. К правому колесу прикреплен рычаг 4, фиксируемый к панели винтом 5. От рычага отходит стрелка 6 к шкале 7 с обозначением весовых групп крыс. В верхней части стоек на расстоянии 60 мм от панели расположены отверстия для закрепления металлических стержней 8. Один конец стержня конусообразно сужен, на другом нанесены неглубокие насечки. Стержни длиной 35 мм, диаметром 6 мм свободно перемещаются и фиксируются винтами стоек 9 в нужном положении. Правый стержень имеет сквозной канал 10 диаметром 1,15 мм, через который вводится инъекционная игла 11 диаметром 1,10 мм. Длина иглы варьирует от 40 до 43,5 мм в зависимости от массы крысы. Торец стержня служит упором для канюли — иглы. Игла соединяется с вакуумным насосом резиновой трубкой через стеклянную 12. К основанию вертикальных стоек строго перпендикулярно к осям стержней прикреплены контрольные стрелки, которые по шкале, фиксированной к панели, указывают угол отклонения стержней от продольной оси прибора.

По средней линии передней части панели на расстоянии 46 мм от поперечной оси прибора прикреплена колодка 13 из текстолита или другого материала. Колодка имеет форму прямоугольника с размерами сторон 48,5×84×97 (мм). Прямой угол лежит на панели и обращен к стойкам. Угол колодки, обращенный к переднему краю панели, равен 31°. По наклонной плоскости колодки скользит и закрепляется в нужном положении с помощью винта 14 металлическая пластина 15 с отверстием 16 для фиксации верхних зубов животного. Края наклонной плоскости колодки имеют бортики, ограничивающие смещение пластины в стороны.

Способ удаления гипофиза через слуховые каналы отличается исключительной простотой и быстротой. Для удаления гипофиза у крыс предлагается таблица параметров прибора в зависимости от массы животного.

Группа	Масса крыс, г	Угол отклонения стержней, град	Длина иглы, мм	Высота фиксатора зубов, мм	Расстояние между концами стержней, мм
1	40 — 60	77	40	52	9 — 10
2	61 — 80	76	41	51	10 — 11
3	81 — 120	75	41,5	50	11 — 12
4	121 — 160	74	42	49	12 — 13
5	161 — 200	73	42,5	48	13 — 14
6	201 — 250	72	43	47	14 — 15
7	Свыше 250	71	43,5	46	15 — 16

Ход работы. 1. Установить стержни в нужном положении с помощью винта соответственно массе крысы. Закрепить один из стержней прочно в стойке и вставить в наружный слуховой проход занаркотизированного эфиром животного. Вставить другой подвижной стержень в слуховой проход и закрепить. Соблюдать строгую симметрию в положении стержней: точное введение стержней в слуховые каналы — неперемненное условие успешного исхода операции.

2. Зафиксировать зубы животного.

3. Вставить в канал правого стержня иглу соответственной длины, которая перфорирует барабанную перепонку, височную кость и, пройдя под тройничным нервом, достигает гипофиза. Удалить гипофиз с помощью вакуумного насоса, соединенного резиновой трубкой с иглой.

4. О полноте удаления гипофиза судить по наличию гипофизарной ткани на ватном тампоне, вставленном в соединительную стеклянную трубку.

5. В послеоперационный период необходимо содержать животных при $+25-27^{\circ}\text{C}$ и вместо воды давать 5%-ный раствор глюкозы.

Опыт 2. Изучение последствий гипопизэктомии самок крыс

Оборудование. Аптекарские весы; торсионные весы; ванночка для вскрытия; два пинцета; ножницы большие; ножницы маленькие; эксикатор; эфир; вата; микроскоп; спички; препаровальные иглы; воронка; раствор гепарина 5000 МЕ/мл; центрифуга; центрифужные пробирки.

Ход работы. 1. Производить забой опытных и интактных крыс методом декапитации для возможности последующего определения в крови гипопизэктомированных крыс содержания кортико-стероидов.

2. Собирать кровь в индивидуальные центрифужные пробирки через воронку. Ополоснуть непосредственно перед взятием крови пробирку и воронку раствором гепарина. Потряхивать пробирку во время взятия крови. После сбора крови центрифугировать пробы 15 мин при 3000 об/мин.

3. Отобрать плазму крови в отдельные подписанные пробирки, закрыть их марлевыми пробками и хранить при -10°C до момента определения гормона.

4. Вскрыть интактных и ранее гипопизэктомированных самок крыс (через 3 недели после операции). Взвесить тела, надпочечники, яичники, матку. Исследовать влагалищный мазок.

Обработка результатов. Результаты вскрытия помещают в таблицу.

Группа крыс	Номера крыс	Масса тела перед операцией, г	Масса тела при забое, г	Масса яичников, мг	Масса матки, мг	Влагалищный мазок	Масса надпочечников, мг	Примечание
Контроль Опыт								

Рекомендуемая литература: [47].

ТЕМА II. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Знакомство с определением стероидных гормонов в биологических жидкостях в практикуме проходит на примере *кортикостероидов* — гормонов коры надпочечников. Все методы определения стероидов включают: экстракцию стероидов из биологических жидкостей, очистку экстрактов и последующее количественное определение. Основное количество метаболитов кортикостероидов выводится из организма в виде «парных» соединений с глюкуроновой и серной кислотами, образующихся в печени. В конъюгированном виде стероиды плохо экстрагируются и поэтому не могут быть количественно определены, поэтому большинство методов определения стероидов в моче включает предварительную стадию гидролиза, т. е. расщепления «парных» соединений стероидов. Гидролиз может быть проведен с помощью ферментов (глюкуронидаза, сульфатаза), нагреванием с концентрированными кислотами и т. п.

После гидролиза свободные стероиды экстрагируют органическими растворителями. Метаболиты стероидов хорошо экстрагируются хлороформом, этилацетатом, метилхлоридом, эфиром и др. Полученные экстракты стероидов промывают растворами NaOH и водой. Далее их обезвоживают, обычно применяя Na_2SO_4 , и используют для количественного определения. Основные методы определения стероидных гормонов основываются на количественном определении отдельных реактивных группировок молекулы, общих для определенной группы стероидов. Наиболее реакционноспособной в молекуле кортикостероида является *боковая цепь*, химическое строение которой характеризует разные группы гормональных соединений, в частности такие, как 17-оксикортикостероиды и 17-кетостероиды.

Цель работы. Определить функциональное состояние коры надпочечников.

Задача 1. Определение суммарных 17-оксикортикостероидов в моче

В понятие 17-оксикортикостероидов (17-ОКС) включают стероиды, содержащие 21 углеводный атом и имеющие 17, 21-диокси-20-кето-боковую цепь, реагирующую с фенилгидразином. Взаимодействие боковой диоксиацетоновой группировки стероидов с фенилгидразином в кислой среде с образованием окрашенных соединений, имеющих максимум поглощения при длине волны 410 нм, называется *реакцией Портера-Сильбера*. Количество образованных хромогенов Портера-Сильбера определяют на фотоэлектроколориметре (ФЭК) или спектрофотометре (СФ) с использованием кристаллического стандарта одного из 17-ОКС, т. е. это — метод группы колориметрических методов, основанных на измерении оптической плотности специфически окрашенных растворов. Основную часть 17-ОКС составляют метаболиты кортизола (F) — глюкокортиконда

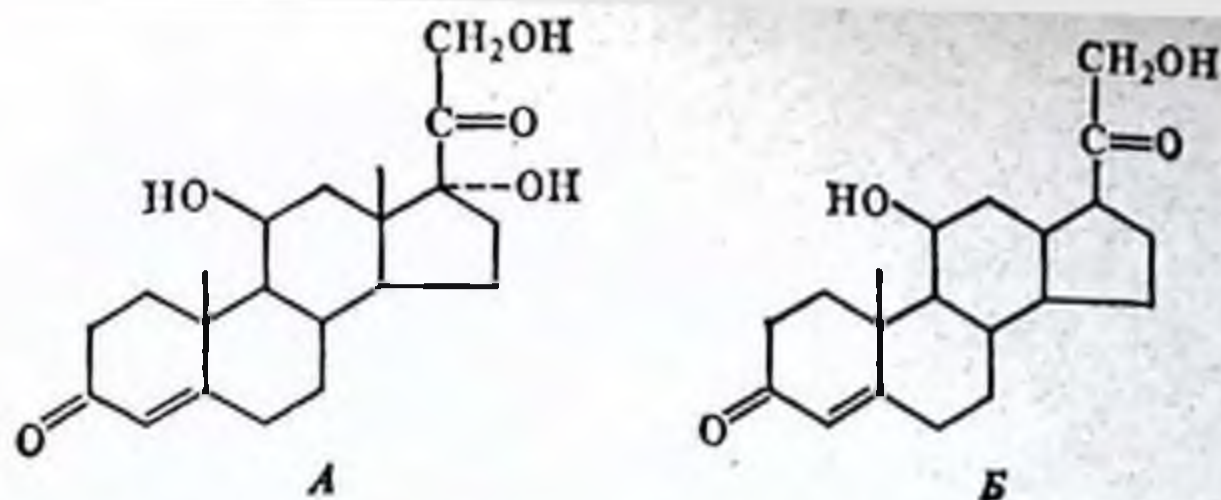


Рис. 179. Строение кортизола (А) и кортикостерона (Б)

человека и морской свинки. Кортикостерон (Б) — основной глюкокортикоид крысы; его метаболиты не входят в группу 17-ОКС, так как не имеют оксигруппы в 17-положении (рис. 179).

В группу 17-ОКС входят производные *F*, образующиеся в процессе его метаболизма (инактивации) в печени (рис. 180). Это кортизон (*E*), тетрагидрокортизол (*THF*), тетрагидрокортизон (*THE*). К 17-ОКС относится также дезоксикортизол (*S*), предшественник кортизола на пути его биосинтеза, и его тетрагидропроизводное (*THS*).

Тетрагидроформы составляют 30—50% метаболитов кортизола в моче; кроме них существенную часть метаболитов представляют кортолы и кортолоны и около 10% — 17-кетостерониды. *F* и *E* составляют лишь несколько процентов от суммы мочевых метаболитов. Кортолы, кортолоны и 17-кетостерониды не содержат диоксиацетеновой группировки (рис. 180) и не определяются данным методом.

Метод Портера-Сильбера позволяет вполне адекватно оценивать глюкокортикоидную функцию коры надпочечников и широко применяется в разных вариантах в клинической и экспериментальной практике для определения 17-ОКС как в моче, так и в крови.

Методика. Основное оборудование. ФЭК или СФ; термостатируемая водяная баня; лабораторные и торсионные весы; водоструйный вакуумный насос; пробирки Портера на 200 мл со шлифом; делительные воронки на 100 мл; химические пробирки на 20 мл; штативы для пробирок и делительных воронок; мерные цилиндры и стаканы разной емкости; колбы Эрленмейера разной емкости; песочные часы на 1, 2, 3 мин; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл и микропипетки на 0,1 и 0,2 мл; мерные центрифужные пробирки; пастеровские пипетки.

Исходные реактивы. Хлороформ для наркоза; метанол, дважды перегнанный; этанол, дважды перегнанный; H_2SO_4 , выдерживающая пробу по Савалю; безводный Na_2SO_4 ; гранулированная $NaOH$; фенилгидразин солянокислый дважды перекристаллизованный из 96%-ного этанола; стандарты стероидов — *F* или *E*; моча для определения 17-ОКС (аликвота 100—200 мл из суточной мочи).

Производные реактивы. 0,1 н. $NaOH$; 4,0 г сухой $NaOH$ довести до 1,0 л дистиллированной H_2O . Серно-этанольная смесь (СЭС): смешать 250,0 мл 62%-ной H_2SO_4 и 125 мл перегнанного этанола¹. Растворы кристаллических стероидов (*F* или *E*) в перегнанном метаноле в концентрации 100 мкг/0,1 мл, в объеме 2 мл.

¹ При работе с серной кислотой соблюдать осторожности!

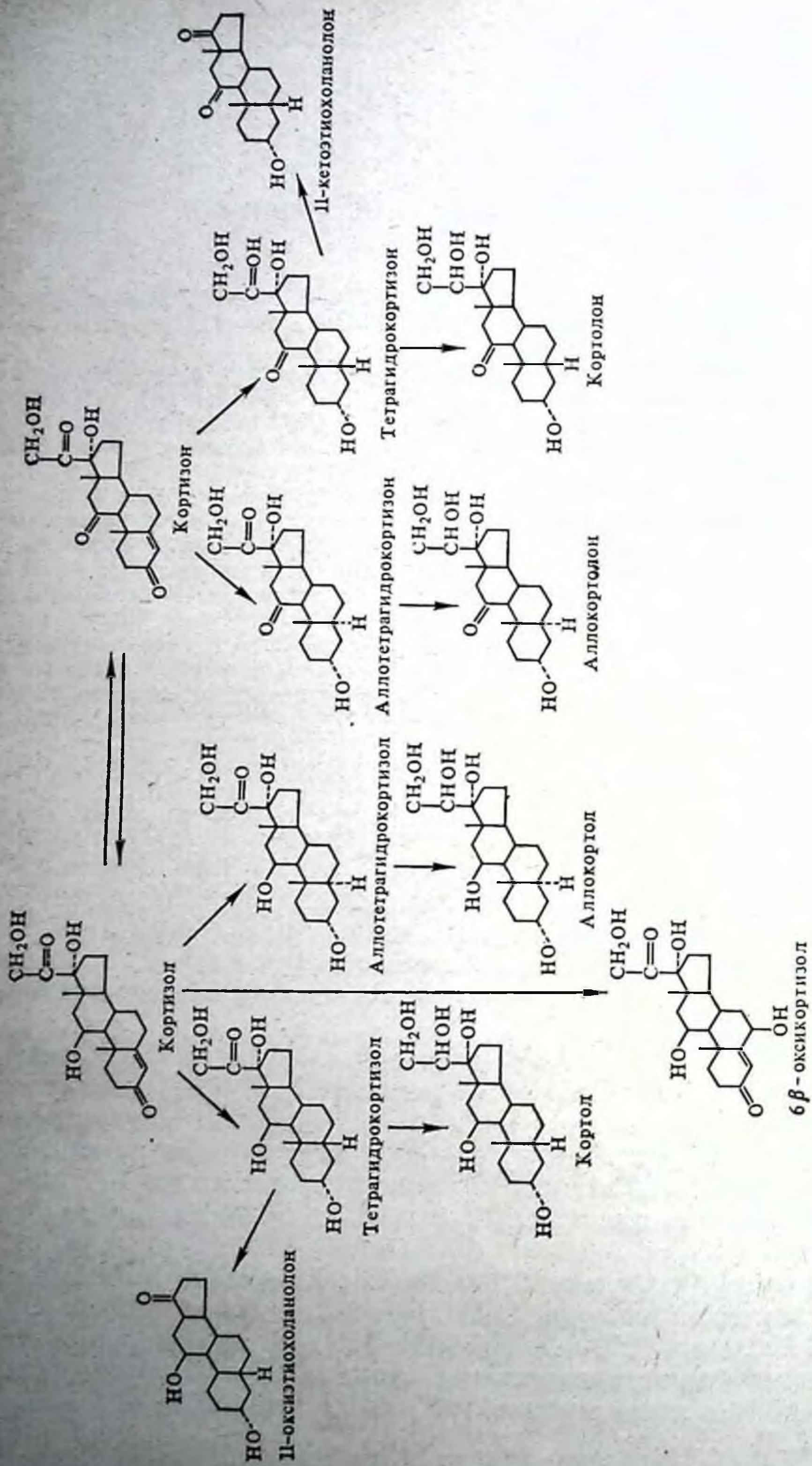


Рис. 180. Превращения кортизола в организме

Ход работы. 1. Экстракция. Отобрать 10 мл мочи в 3 специальные пробирки Портера на 200 мл, добавить 50 мл наркозного или очищенного хлороформа и, закрыв пробирки шлифованной пробкой, встряхивать 2 мин. После расслаивания смеси отсосать верхний водный слой пастеровской пипеткой с помощью водоструйного насоса.

2. Промывка хлороформного экстракта. Добавить 7,5 мл 0,1 н. NaOH, встряхивать 15 с, после расслаивания жидкостей отсосать верхний водный слой.

3. Продолжение промывки. Добавить 3 мл дистиллированной воды, встряхивать 15 с. После расслаивания смеси отсосать верхний слой. Далее пользоваться только сухой посудой.

4. Удаление следов воды из хлороформа. Добавить 2 г безводного Na_2SO_4 , встряхивать 1 мин, оставить на 10 мин.

5. Забор аликвоты. Осторожно, чтобы не попал сульфат, перенести с помощью сухого цилиндра 35 мл хлороформного экстракта в сухие делительные воронки № 1, 2, 3.

6. Приготовление фенилгидразинового реактива для проведения цветной реакции. Использовать заранее приготовленную СЭС и двукратно перекристаллизированный фенилгидразин. Фенилгидразин взвешивать на торсионных весах.

Расчет фенилгидразинового реактива (ФГР)

Количество проб	Серно-этанольная смесь, мл	Фенилгидразин, мг
5	20	8,8
8	32	14,1
9	36	15,8
10	40	17,6
14	56	24,6

Взвешенный фенилгидразин высыпать в колбу с притертой пробкой, залить СЭС, плотно закрыть пробкой и растворить при непрерывном помешивании.

7. Приготовление стандарта, т. е. пробы с известным количеством стероида. В чистую, сухую центрифужную пробирку микропипеткой внести 0,05, 0,075 или 0,1 мл (50, 75 или 100 мкг) стандартного раствора E или F. Пробирки обмыть порциями по 5,0 мл из 35 мл очищенного хлороформа, который перенести в делительную воронку № 4.

8. Экстракция стероидов ФГР и контроли на неспецифическую окраску веществ мочи и реактивов. Помимо имеющихся четырех делительных воронок (№ 1, 2, 3 — аликвоты из хлороформного экстракта мочи, № 4 — хлороформный раствор стандарта) взять делительную воронку № 5, в которую чистым цилиндром налить 35 мл хлороформа.

Добавить во все воронки мерной центрифужной пробиркой по 4,0 мл следующих реактивов: а) в 1-ю, 2-ю, 4-ю—по 4,0 мл ФГР. Эти пробы содержат стероиды мочи и стандарт стероида, добавление к ним ФГР позволит экстрагировать сумму определяемых соединений и некоторых примесей; б) в 5-ю налить также 4,0 ФГР. Эта проба послужит контролем для опытных проб, ибо даст окраску специфического реактива, реагирующего с различными примесями, имеющимися в хлороформе; в) в 3-ю воронку налить 4,0 мл СЭС. Эта проба даст неспецифическую окраску стероидов мочи.

Делительные воронки встряхивать 1 мин. Нижний хлороформный слой слить через краны и отбросить. Верхний слой слить осторожно через верх в чистые пробирки, помеченные, соответственно, 1—4, 5.

9. *Проведение цветной реакции.* Все 5 пробирок поставить в штативе на водную баню 60°C на 30 мин. Баню включить за 30 мин до проведения цветной реакции. В 1-й, 2-й, 4-й пробирках разовьется желтая окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству 17-ОКС.

10. *Определение экстинкции на ФЭК'е.* Установить ФЭК по чистой СЭС при синем светофильтре (№ 3). Оставив в левой части ФЭК'а раствор СЭС, определить следующие экстинкции: E_5 —ФГР—неспецифическая окраска реактивов; E_4 —то же, но со стандартом—неспецифическая окраска реактивов + специфическая окраска стандарта; E_3 —неспецифическая окраска веществ, экстрагированных из мочи и реактивов; $E_{1,2}$ —сумма специфической и неспецифической окраски стероидов мочи.

Обработка результатов. Рассчитывают суточную экскрецию 17-ОКС (мг/сут).

$E_4 - E_5 = E_{\text{ст}}$ —специфическая окраска стандарта. $E_{\text{ст}} : P_{\text{ст}} = Q$, где $P_{\text{ст}}$ —количество стандарта в пробе (мкг), а Q —удельная экстинкция стандарта в расчете на 1 мкг стандарта. $E_{1,2} - E_3 - E_5 = E_{\text{мочи}}$ —специфическая экстинкция 17-ОКС мочи. $E_{\text{мочи}} : Q = P_{\text{мочи}}$ —количество 17-ОКС (мкг) в аликвоте хлороформного экстракта (35 мл из 50 мл). 50 мл экстракта соответствуют 10 мл мочи, а 35 мл—7 мл мочи. Для расчета суточной экскреции 17-ОКС необходимо знать диурез (количество мочи, выделяемой за сутки).

Общий вид формулы для расчета суточной экскреции 17-ОКС: $X = E_{\text{мочи}} \cdot D / Q \cdot 7 \cdot 1000$ (мг/сут), где D —диурез. Оформляют таблицу.

$E_{1,2}$	E_3	E_4	E_5	$E_{\text{ст}}$	$E_{\text{мочи}}$	Диурез	Экскреция 17-ОКС, мг/сут

Рекомендуемая литература: [37]; [53].

Задача 2. Определение суммарных 17-кетостероидов в моче

Для оценки функционального состояния коры надпочечников часто используют метод определения суммарного содержания нейтральных 17-кетостероидов (17-КС). Однако в эту фракцию входят соединения, различные по происхождению (метаболиты гормонов коры надпочечников и половых желез): 17-КС у мужчин на 70% надпочечникового и на 30% гонадного происхождения; у женщин доля 17-КС надпочечникового происхождения гораздо больше. Большинство 17-КС, таких, как *андростерон* и *этиохоланолон* (рис. 181), являются продуктами обмена стероидов, образующимися в печени из дегидроэпиандростерона, секретируемого корой надпочечников и гонадами, и из тестостерона — гормона семенников. Некоторые из 17-КС, имеющие кислородную функцию у 11-го углеродного атома, происходят из *F* и *E* (см. рис. 180), а также из 11-окси- и 11-кетоандростендиона, секретируемых корой надпочечников. Разнообразие источников, из которых образуются мочевые 17-КС, снижает ценность метода суммарного определения 17-КС для оценки функционального состояния коры надпочечников. Вместе с тем изучение содержания 17-КС в моче — важный показатель андрогенного статуса организма, мужского и женского, в особенности при некоторых видах надпочечной патологии, когда резко увеличивается секреция надпочечных андрогенов.

С химической точки зрения 17-КС — стероиды с 19 углеродными атомами (C_{19} -стероиды), у которых отсутствует характерная для C_{21} -стероидов (кортизол, кортикостерон) боковая цепь, присоединяющаяся к 17-му углеродному атому; вместо нее имеется кетогруппа, откуда и произошло название этих стероидов. Наличие 17-кетогруппы обуславливает способность этих стероидов вступать в щелочной среде в присутствии спирта в реакцию с метадинитробензолом (реакция Циммермана). При этом образуются соединения с фиолетовым окрашиванием и максимумом поглощения при 510 нм. Интенсивность окраски измеряют на ФЭК'е или СФ и сравнивают с окраской известного количества кристаллического стандарта одного из 17-КС.

Методика. Основное оборудование. ФЭК или СФ; лабораторные и торсионные весы; химические пробирки на 20 и 40 мл; делительные воронки на 250 или 500 мл; мерные центрифужные пробирки; штативы для пробирок и воронок; мерные цилиндры и стаканы разной емкости; колбы Эрленмейера разной емкости; песочные часы на 3 мин; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл и микропипетки на 0,1 и 0,2 мл; воронки и бумажные фильтры для фильтрования.

Исходные реактивы. Эфир для наркоза; абсолютный этанол; этанол и метанол, дважды перегнанные; концентрированная HCl ; ледяная CH_3COOH ; метадинитробензол, дважды перекристаллизованный из этанола; гранулированные $NaOH$ и KOH ; стандарты кристаллические стероидов — этиохоланолон (Э) или андростерон (А); моча для определения 17-КС — аликвота 200 мл из суточной мочи.

Производные реактивы. 10%-ный раствор $NaOH$; к 100 г сухой $NaOH$ добавить 900 мл дистиллированной H_2O . Растворы кристаллических стероидов (Э или А) в метаноле в концентрации 100 мкг/0,1 мл (2 мл).

Ход работы. 1. Гидролиз. В большие пробирки на 40 мл № 1 и 2 внести 20 мл исследуемой мочи, 3 мл HCl и 1 мл CH_3COOH . Использовать для этого *пипетку со шприцем* или мерную центрифужную пробирку. Подогрев заранее воду в термостойком стакане с ватой на дне, поместить в него пробирки с мочой и закрыть их каплеуловителями или центрифужными пробирками (с загнутым

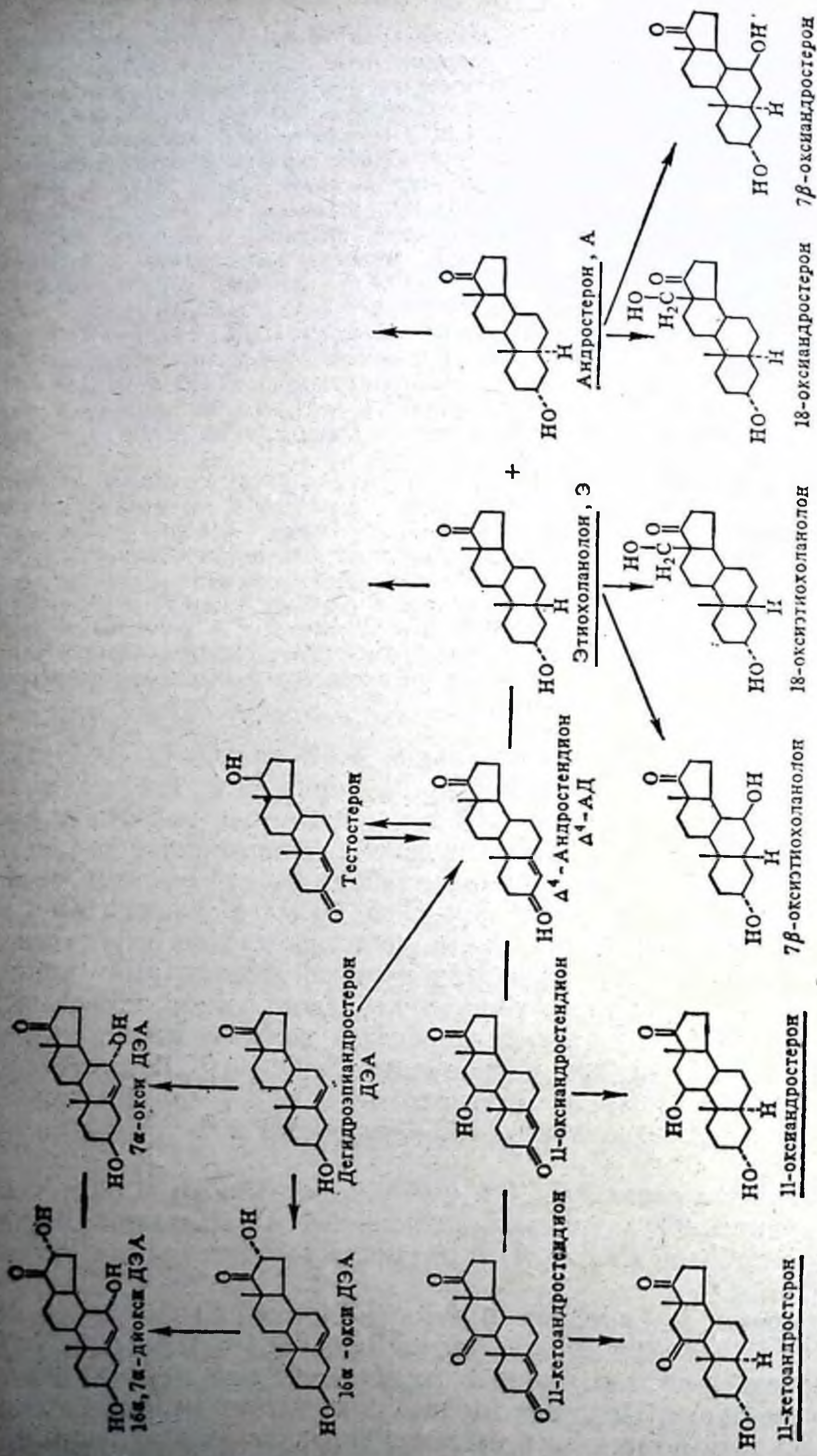


Рис. 181. Метаболизм андрогенов

краем) с холодной водой внутри них. Вести гидролиз 15 мин при кипящей водяной бане.

2. *Экстракция.* Охладить пробирки в холодной воде со льдом. Мочу перелить в делительные воронки №1 и 2. Добавить туда 30 мл эфира и экстрагировать 2 мин, периодически выпуская его пары из воронки. Пробка делительной воронки должна быть закрыта так, чтобы отверстия на ней и на воронке не совпадали. После встряхивания открыть пробку, чтобы ее не выбило. Если образуется неразбивающаяся эмульсия, добавить еще некоторое количество эфира. После расслоения смеси слить нижний водный слой через кран воронки.

3. *Очистка эфирного экстракта.* В делительную воронку налить 8 мл 10%-ного раствора NaOH. Повторить процедуру 2, слить нижний слой. Очистку щелочью повторить дважды.

4. *Продолжение очистки экстракта.* В воронку налить 12 мл дистиллированной воды, повторить процедуру 2. Дать хорошо отстояться и тщательно слить нижний водный слой. Дальше использовать только сухую посуду.

5. *Упаривание эфира и получение сухого осадка стероидов.* Вылить эфирный экстракт через край делительной воронки (убедившись, что экстракт не содержит следов воды) в сухие пробирки объемом 40 мл, обозначив их 1 и 2-а. Выпарить все пробирки на водяной бане под тягой, доливая эфир малыми порциями. После выпаривания добавить 5 мл чистого эфира в пробирку 2-а и перенести половину (2,5 мл) с помощью чистой пипетки на 5,0 мл в пробирку на 40 мл, обозначив ее 2-б. Выпарить эфир в пробирках 2-а и 2-б. Проба 1 будет использована в следующей задаче для разделения 17-КС на фракции. Пробы 2-а и 2-б, а также стандарт (100 мкг этиохоланолона) будут использованы для определения суммарных 17-КС.

6. *Приготовление реактивов для цветной реакции.* Растворить 5,6 г КОН в 20 мл абсолютного этилового спирта и профильтровать. Растворить 40 мг дважды перекристаллизованного метадинитробензола в 20 мл этилового спирта.

7. *Проведение цветной реакции и постановка контролей на неспецифическую окраску.* В чистую пробирку 4, пробирку со стандартом 3 и пробирку со стероидами мочи 2-а прилить: 0,2 мл спирта абсолютного, 0,2 мл спиртового раствора КОН, 0,2 мл спиртового раствора метадинитробензола. В пробирку 2-б прилить: 0,4 мл спирта, 0,2 мл спиртового раствора КОН. Поскольку в 2-б нет метадинитробензола, то там разовьется только неспецифическая окраска. Все пробирки поставить на 45 мин в темное место. Добавить после инкубации 15 мл спирта во все пробирки, перемешать.

8. *Определение экстинкции на ФЭК'е.* Установить ФЭК по спирту (зеленый светофильтр № 2). Определить по отношению к нему: E реактива (4-я пробирка); E стандарта (3-я пробирка), E мочи неспецифическая (2-б), E мочи неспецифическая + специфическая (2-а).

Обработка результатов. Рассчитывают суточную экскрецию 17-КС. $E_{ст} : P_{ст} = K$, где $P_{ст}$ — количество стандарта (мкг), K — удельная экстинкция, приходящаяся на 1 мкг стандарта. $E_{2a} - E_{2b} - E_4 = E_{мочи}$ — специфическая экстинкция мочи.

$E_{мочи} : K = P_{мочи}$ — количество 17-КС мочи в пробе (мкг). Поскольку проба 20 мл была разделена на 2 порции, то P соответствует 10 мл. Для расчета суточной экскреции 17-КС надо знать диурез. Общая формула для расчета суточной экскреции 17-КС: $X = E_{мочи} \cdot D / K \cdot 10 \cdot 1000$ (мг/сут), где D — диурез. Оформляют таблицу:

E_{2a}	E_{2b}	E_4	$E_{ст}$	$E_{мочи}$	K	Диурез	Экскреция 17-КС, мг/сут

Рекомендуемая литература: [53].

Задача 3. Разделение 17-кетостероидов и 17-оксикортикостероидов на фракции с помощью тонкослойной хроматографии

Более полные данные о функции коры надпочечников можно получить путем изучения индивидуальных стероидов мочи. Определение содержания любого из них, а еще лучше нескольких, в моче и крови всегда дает более ценные результаты, чем групповое определение. Наиболее надежными методами определения индивидуальных соединений в моче или крови являются *хроматографические методы*. Для смесей стероидных соединений используют методы хроматографии на колонках, бумаге или в тонком слое сорбента. При работе с колонками часто используют принцип *адсорбционной* хроматографии; при работе на бумаге — принцип *распределительной* хроматографии; *тонкослойная* хроматография сочетает в себе принципы адсорбционной и распределительной хроматографии. Быстрый способ хроматографирования в тонком слое в последние годы находит все большее применение в клинической практике. Преимуществами тонкослойной хроматографии является быстрота разделения и возможность работы с малыми количествами веществ.

Сущность метода тонкослойной хроматографии состоит в следующем. На стеклянную пластину или слой фольги наносят тонкий слой адсорбента: обычно это силикагель или окись алюминия. Для закрепления тонкого слоя адсорбента на пластине к нему добавляют 15% гипса и немного воды; при помощи гипса слой адсорбента «схватывается» со стеклом. Закрепленные слои высушивают на воздухе и активируют при 120°C в термостатированном шкафу. Разделение веществ на тонком слое сорбента в значительной мере зависит от размера частиц сорбента, толщины слоя, его равномерности и активности. Оптимальная толщина слоя 0,3—0,4 мм. Приготовление тонкого слоя осуществляют с помощью специального прибора для нанесения. На передней стенке этого прибора укреплена стальная пластина на винтах, позволяющих регулировать расстояние между пластиной и стеклом и получать равномерный слой адсорбента заданной толщины.

После того как пластина готова, на слой наносят испытуемые пробы с помощью микропипеток или микрошприцев и помещают пластину в хроматографический бачок, на дне которого налита смесь соответствующих растворителей (существует значительное число систем растворителей в зависимости от того, какие вещества надо разделить). Сосуд герметически закрывают и пропускают растворитель в восходящем направлении через слой до верхнего края пласти-

ны. Разделяемые компоненты смеси перемещаются с различной скоростью в направлении движения растворителя. Скорость перемещения различных стероидов зависит от степени их сорбции адсорбентом и степени их растворимости в подвижной фазе, что, в свою очередь, обусловлено особенностями химической структуры стероида. Положение того или иного стероида на тонком слое характеризуется коэффициентом распределения R_f , определяемым отношением пути, пройденного веществом, к пути, пройденному растворителем. При постоянстве условий хроматографирования это величина постоянная. Для обнаружения различных стероидов на хроматограмме после разделения используют их способность давать окрашенные соединения со специфическими химическими реагентами. Этот момент работы называется «проявлением» хроматограммы, для чего ее опрыскивают специфическим реактивом, используя тонкие распылители. Для простейшей идентификации окрашенных пятен или полос стероидов после их разделения часто пользуются сравнением их положения на хроматограмме с положением соответствующих стероидов-стандартов, нанесенных на хроматограмму рядом с испытуемой пробой.

Опыт 1. Определение 17-кетостероидов в моче по фракциям

Методика. Основное оборудование. Хроматографический бачок; стекла 12×18 (см); прибор для нанесения тонкого слоя; термостатируемый шкаф; микропипетки для нанесения; фен для подачи тока теплого воздуха; лабораторные весы; мерные цилиндры; химические пробирки; пульверизатор с тонким распылением; колбы Эрленмейера для приготовления суспензии адсорбента.

Исходные реактивы. Эфир для наркоза; бензол для криоскопии; метанол и хлороформ, дважды перегнанные; перекристаллизованный метадинитробензол; Al_2O_3 II степени активности по Брокману; гипс медицинский; кристаллические стандарты 17-КС: дегидроэпиандростерон (ДЭА), андростерон (А), этиохоланолон (Э), 11-окси- или 11-кето-андростерон (11-окисленные 17-КС); гранулированная КОН.

Производные реактивы. Смесь метанол — хлороформ 1:1 (20,0 мл); смесь выпаренных растворов стандарта 17-КС (из метанола) по 200 мкг каждого.

Ход работы. Использовать только сухую посуду. 1. *Подготовка пластины с тонким слоем.* Пластину 12×18 (см) с заранее нанесенным адсорбентом (смесь: 9,0 г Al_2O_3 , 1,35 г гипса и 12,0 мл H_2O) выдержать 2 ч в сушильном шкафу при 120°C.

2. *Подготовка камеры для хроматографии.* Налить на дно камеры смесь 25 мл эфира и 75 мл бензола. Растворители хорошо перемешать. У одной из стенок камеры поместить лист фильтровальной бумаги. Камеру закрыть притертым стеклом и оставить насыщаться парами растворителей на 1,5 ч.

3. *Нанесение экстракта 17-КС.* В пробирку 1, оставшуюся от задачи 2, содержащую в виде осадка экстрагированные 17-КС, добавить примерно 0,2 мл смеси хлороформ-метанол и растворить осадок. То же самое делают в случае стандартов. Специальными пипетками с тонким кончиком нанести 4—5 пятен размером 0,2—0,5 см на стартовую линию тонкого слоя на расстоянии 1,5—2 см от бокового края и 3 см от нижнего края. Нанести в одну точку

смесь стандартов ДЭА, А и Э. Чтобы ускорить испарение растворителя, использовать вентилятор, фен или ток воздуха.

4. *Проведение хроматографии.* Пластику поставить в бачок по диагонали. Наблюдать за фронтом движения растворителей. Когда фронт растворителя подойдет к верхнему краю, пластину вынуть и подсушить на воздухе или в термостате. Процедуру повторить 3—4 раза. Первое пятно пигментов, примерно соответствующее первой фракции 17-КС, должно отойти на 2—3 см.

5. *Приготовление проявляющего раствора.* 240 мг мета-динитробензола растворить в 24 мл 96%-ного спирта. 10 г КОН растворить в 10 мл воды. К 6 мл 1-го раствора добавить 2 мл 2-го. Перемешать и влить в пульверизатор.

6. *Проявление 17-КС.* Сухую пластину слегка нагреть и теплую опрыскать проявляющим раствором. Выдержать несколько минут в сушильном шкафу при 50—60°C: 17-КС приобретают фиолетовый цвет. Их последовательность сверху вниз: ДЭА, А, Э, 11-окисленные 17-КС.

7. *Снятие стероидов с хроматограммы.* Для количественного определения, которое здесь производиться не будет, требуется снять слой с участков, соответствующих проявившимся пятнам, проэлюировать стероиды из адсорбента в растворитель, выпарить последний и провести определение стероидов по цветной реакции, описанной в задаче 2.

Обработка результатов. Зарисовать хроматограмму, вычислить R_f стероидов.

Рекомендуемая литература: [2]; [37].

Опыт 2. Определение 17-оксикортикостероидов в моче по фракциям

Методика. Оборудование. Хроматографический бачок, фен, микропипетки для нанесения стероидов на хроматограмму, пульверизатор, мерные цилиндры, химические пробирки.

Исходные реактивы. Хлороформ для наркоза и метанол, дважды перегнанные; абсолютный этанол; пластины «Силуфол» с тонким слоем силикагеля; краситель синий тетразолий; гранулированная NaOH; кристаллические стандарты стероидов: F, E, THF, TNE, S, THS.

Производные реактивы. 0,125%-ный раствор синего тетразолия: к 31,25 мг добавить 25,0 мл дистиллированной воды. 4 н. NaOH: 16,0 г довести до 100 мл H_2O . Смесь выпаренных растворов стандартов 17-ОКС (из метанола) по 100 мкг каждого. Смесь метанол-хлороформ 1 : 1.

Ход работы. 1. Обработка мочи. Обработать мочу, как в задаче 1 (пункты 1—4), увеличив исходное количество мочи до 30—50 мл и, соответственно, количество хлороформа, необходимого для экстракции.

Упарить обезвоженный экстракт на водяной бане при 45°C под

вакуумом. Сухой остаток, содержащий стероиды, будет наноситься на пластину с тонким слоем силикагеля.

2. *Подготовка хроматографического бачка.* За 1,5 ч до нанесения стероидов на пластину в бачок залить смесь: хлороформ, дважды перегнанный — 45 мл, и этанол абсолютный — 5 мл. Бачок плотно закрыть крышкой с применением вакуумной смазки. Насыщение наступает, когда лист фильтровальной бумаги, вложенный в бачок, становится влажным до конца. Оберегать бачок от прямых солнечных лучей!

3. *Нанесение стероидов на пластину «Силуфол».* Пробирки с сухим остатком стероидов обмыть 0,2 мл смеси метанол-хлороформ. Нанесение произвести (микропипеткой с оттянутым концом) в виде полосы 1,0—1,5 см, состоящей из отдельных мелких пятен диаметром 0,2—0,3 мм. Обмывание пробирки с последующим нанесением проводить 3—4 раза. На каждую пластину нанести две пробы. Полосы нанесенных стероидов должны отстоять от нижнего края и боковых краев пластины не менее чем на 1,5 см. Оберегать пластину от прямых солнечных лучей!

4. *Хроматография.* Пластины поместить в бачок. После однократного прохождения растворителя по пластине вынуть ее и подсушить на воздухе в течение 15—20 мин. Снова поместить в бачок. Хорошее разделение стероидов достигается двукратным прохождением растворителя по пластине.

5. *Проявление стероидов на пластине.* Опрыснуть пластины из пульверизатора с мелким распылением. Смесь для проявления состоит из 2,0 мл 0,125%-ного раствора синего тетразолия и 3,0 мл 4 н. NaOH. Участки, содержащие стероиды (от старта идут в следующем порядке: *THF, THE, F, THS, E, S*), наметить иглой, снять скальпелем в отдельные пробирки и элюировать абсолютным этанолом. Количественное определение проводить аналогично определению 17-ОКС в суммарном виде измерением интенсивности окраски с фенилгидразином (реакция Портера-Сильбера) на ФЭК'е или СФ.

Обработка результатов. Зарисовать хроматограмму, вычислить R_f стероидов.

Рекомендуемая литература: [37].

Задача 4. Флуорометрические методы определения кортикостероидов в плазме крови

Методы флуорометрического определения кортикостероидов благодаря высокой чувствительности и простоте позволяют использовать небольшие объемы крови, давая возможность увеличить число анализов, что существенно при определении функционального состояния коры надпочечников по данным содержания гормонов в крови. Современные флуорометрические методы позволяют определять с достаточной точностью сотые доли микрограмма кортикостероидов в 0,2—1,0 мл плазмы.

Наиболее стабильной и специфичной является флуоресценция, вызываемая действием на кортикостероиды кислот, в частности концентрированной H_2SO_4 в смеси с этанолом. Способность кортикостероидов флуоресцировать не нашла еще удовлетворительного объяснения, хотя она более или менее специфична

для *F* и *B* — 11-оксикортикостероидов. *B* флуоресцирует в несколько раз сильнее, чем *F*. Из большого количества соединений, выделенных из надпочечников, только эти два гормона и их производные с оксигруппой у 20-го углеродного атома обладают способностью флуоресцировать. Предполагают, что для проявления флуоресценции важно одновременное присутствие в молекуле стероида Δ^4 -3-кетогруппы, 11 β -оксигруппы и 21-оксигруппы (см. рис. 179). Однако присутствие всех этих группировок не является строго обязательным.

Благодаря тому, что по флуоресценции определяют только биологически активные гормоны (*F*, *B*), указанные методы пригодны для изучения только неметаболизированных стероидов мочи. Максимум света, возбуждающего флуоресценцию кортикостероидов, соответствует примерно 475 нм, а максимум возбужденного света наблюдается при 550 нм.

Методика. Оборудование. Флуориметр (спектрофлуориметр); водоструйный насос; прибор для отгонки под вакуумом; пробирки на 20 мл со шлифом и притертыми пробками; мерные цилиндры; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; песочные часы на 1 мин.

Исходные реактивы. Гексан; метиленхлорид и этанол, дважды перегнанные; H_2SO_4 , выдерживающая пробу по Савалю; Na_2CO_3 ; кристаллические стандарты стероидов *F* и *B*; плазма крови человека для определения.

Производные реактивы. 0,2 н. раствор Na_2CO_3 ; стандартный раствор *F* 2 мкг/мл (навеску 200 мкг *F* растворяют в 10—15 каплях этанола и доводят до 100,0 мл водой в мерной колбе). Стандартный раствор *B* — 1 мкг/мл (навеску 100 мкг *B* растворяют так же, как *F*). Смесь стандартов (для определения в плазме крови человека): смесь № 1 — 10 мл стандартного раствора *F* + 5 мл стандартного раствора *B*, довести до 100 мл водой; смесь № 2 — 20 мл раствора *F* + 10 мл раствора *B*, довести до 100 мл водой.

Ход работы. 1. Обработка плазмы крови и контрольных проб гексаном. 0,5 мл плазмы перенести пипеткой в пробирки 1 и 2 с притертой пробкой. В пробирку 3 («слепая» проба) добавить 0,5 мл дистиллированной воды. В пробирку 4 — 0,5 мл смеси № 1. В пробирку 5 — 0,5 мл смеси № 2. Добавить 1,5 мл гексана, энергично встряхивать 1 мин. Экстракцией гексаном удаляют из плазмы липиды, мешающие определению кортикостероидов.

2. Удаление гексана. После расслаивания смеси удалить гексан осторожным и тщательным отсасыванием пастеровской пипеткой, присоединенной к водоструйному насосу. Остатки гексана отогнать под вакуумом, присоединяя пробирки к прибору.

3. Экстракция стероидов метиленхлоридом. В пробирки 1—5 после удаления гексана добавить по 5,0 метиленхлорида, закрыть пробками, энергично встряхивать 1 мин.

4. Удаление экстрагированной плазмы. После расслаивания смеси отсосать плазму (или водный слой) с помощью пастеровской пипетки, присоединенной к насосу.

5. Промывка метиленхлоридного экстракта. К экстракту в каждую пробу добавить 0,25 мл 0,2 н. Na_2CO_3 , встряхивать 1 мин, отсосать пастеровской пипеткой, присоединенной к насосу. Добавить в пробирки 1—5 0,25 мл дистиллированной воды, встряхивать 1 мин, отсосать.

6. Приготовление смеси H_2SO_4 и этанола и обработка ею экстракта. К 27,0 мл H_2SO_4 добавить 9,0 мл этанола. Из пробирок 1—5 перенести в чистые пробирки с притертой пробкой 1—5 по 4 мл промытого экстракта и добавить в каждую пробирку по 2 мл смеси концентрированной H_2SO_4 и этанола (3:1), приготовленной в день определения. Встряхивать 1 мин, метиленхлорид полностью удалить, отсосав пастеровской пипеткой. Пробы оставить на 1 ч.

7. Измерение флуоресценции на флуориметре. Измерить флуоресценцию при максимуме пропускания около 475 нм и при максимуме флуоресценции около 550 нм.

Обработка результатов. Результаты измерения занести в таблицу, где $P_{1,2}$ — флуоресценция опытных проб, K — флуоресценция «слепой» пробы, $P_{ст4,5}$ — флуоресценция стандартных проб, $C_{ст4,5}$ — концентрация кортикостероидов в стандартных пробах, Q — условная величина, $Q_{4,5} = C_{ст4,5} / (P_{ст4,5} - K)$; $Q = (Q_4 + Q_5) / 2$; X — определяемая концентрация гормонов (мкг/100 мл плазмы): $X = (P - K) \cdot Q$

$P_{1,2}$	K	$P_{ст 4,5}$	$C_{ст 4,5}$	$Q_{4,5}$	Q	X

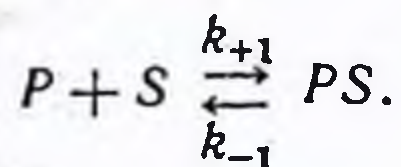
Рекомендуемая литература: [28 — с. 137—145].

ТЕМА III. БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ ГОРМОНЫ, И САТУРАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГОРМОНОВ

В кровяном русле значительная, а во многих случаях подавляющая часть гормонов находится в составе комплексов с различными белками плазмы и форменных элементов крови. В других тканях (например, в органах-мишенях) основная доля гормонов также находится в виде комплексов с внутриклеточными белками или белками, расположенными на наружной поверхности плазматической мембраны клеток.

В зависимости от характера взаимодействия гормона с белками различают два основных типа комплексообразующих белков (КОБ) — специфические и неспецифические. Для специфических КОБ характерны высокое сродство к гормону, ограниченная связывающая емкость и выраженная избирательность (гормональная специфичность) сродства. Для неспецифических КОБ все эти характеристики требуют приставки «не»: у этих белков невысокое сродство к гормону, они ненасыщаемы гормоном в пределах его физиологических концентраций, этим белкам свойственна неизбирательность или низкая избирательность сродства. Отличительный признак специфических КОБ — регулируемость их содержания в тканях. В зависимости от их локализации и функции специфические КОБ подразделяют на три основных класса: транспортные, рецепторные и иммунные (иммунные КОБ в интактном организме отсутствуют; их образование, как правило, вызывают введением животным гормона, ковалентно присоединенного к чужеродному белку). Знание связывающих свойств КОБ существенно как при исследовании их функциональной роли в норме и патологии, так и при разработке методов количественного определения гормонов с помощью сатурационного анализа (СА).

Основные параметры комплексообразования. При анализе взаимодействия гормонов с КОБ исходят из предположения о применимости закона действия масс. При этом подразумевается, что связывание молекулы гормона одним связывающим участком КОБ не влияет на связывающую активность других участков, т. е. связывающие участки КОБ функционируют независимо друг от друга. В системе, содержащей один лиганд (S) и один КОБ (P), имеет место обратимая реакция:



В соответствии с законом действия масс при равновесии:

$$[PS]/[P][S] = k_{+1}/k_{-1} = K_a, \quad (I)$$

где k_{+1} — константа скорости ассоциации, k_{-1} — константа скорости диссоциации, K_a — равновесная константа ассоциации.

Поскольку экспериментатор, как правило, следит за реакцией комплексообразования по поведению лиганда и измеряет уровень связывания при различных его концентрациях и неизменной концентрации КОБ, удобно ввести следующие обозначения: $b = [PS]$ — концентрация связанного лиганда (b — от англ. bound — связанный); $u = [S]$ — концентрация несвязанного лиганда (u — от англ. unbound — несвязанный); $N = [PS] + [P]$ — суммарная концентрация оккупированных лигандом и свободных связывающих участков. При этих обозначениях равенство I принимает вид: $b/(N-b)u = K_a$ или

$$b/u = K_a (N - b). \quad (II)$$

В координатах b/u от b (координаты Скэтчарда) эта зависимость выражается нисходящей прямой линией (рис. 182, А).

Точка пересечения прямой с осью абсцисс b дает величину N , а с осью ординат b/u — величину $K_a N$. Измеряя количество связанного и свободного лиганда при различных его добавках, можно построить график зависимости равновесных значений b/u от b и путем экстраполяции результирующей прямой к осям координат определить величины N и K_a . Для специфических КОБ величины K_a лежат обычно в диапазоне 10^6 — 10^{10} л/моль, для неспецифических КОБ — менее 10^5 л/моль. При повышении температуры величины K_a специфических КОБ, как правило, снижаются. Величины N специфических КОБ в неразведенном биологическом материале обычно соответствуют физиологическим концентрациям гормонов (10^{-6} — 10^{-10} моль/л). Что касается неспецифических КОБ, то способностью неспецифически связывать гормоны обладают, видимо, очень многие белки и, в частности, сывороточный альбумин. Поэтому суммарная концентрация связывающих участков неспецифических КОБ в данном образце биологического материала оказывается значительно более высокой по сравнению с физио-

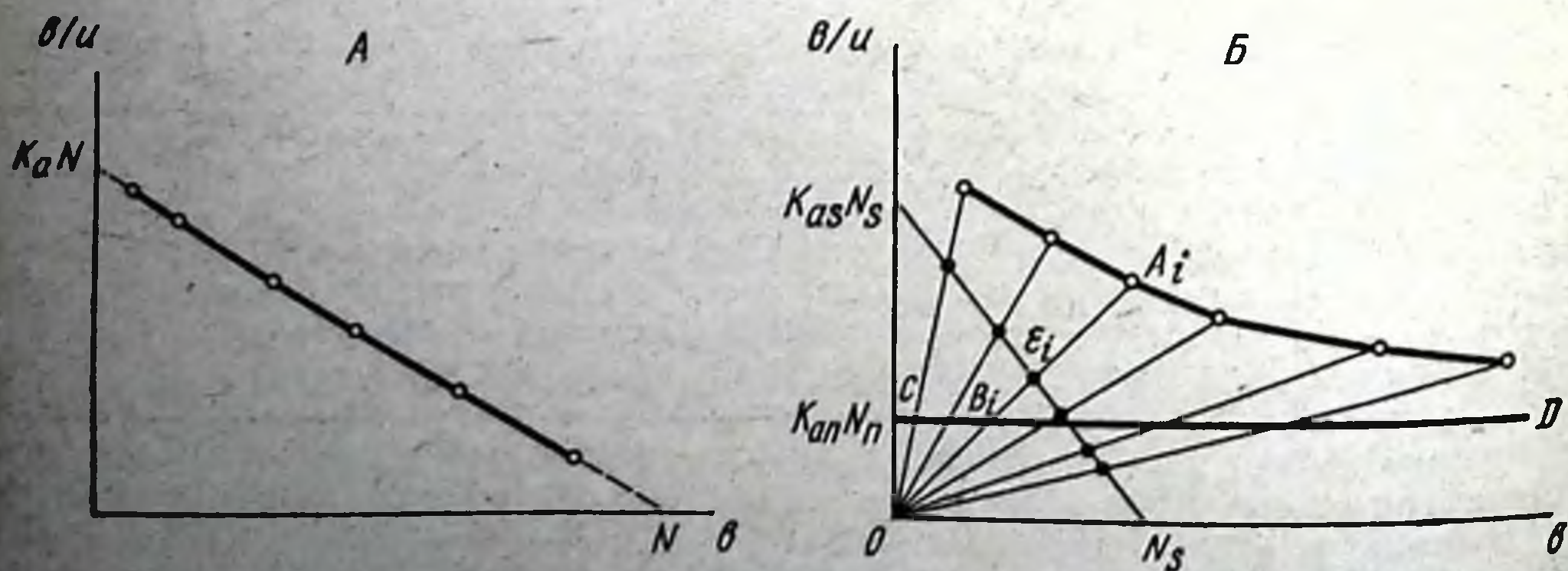


Рис. 182. Скэтчардовский график специфического гормон-белкового взаимодействия (А) и графический метод вычленения специфического связывания лиганда в координатах Скэтчарда (Б) (объяснение см. в тексте)

логическими концентрациями гормона, т. е. $N \gg b + u$. В этом случае равенство II приобретает вид $b/u = K_a N$.

На графике Скэтчарда эта зависимость выражается прямой линией, параллельной оси абсцисс, и пересекающей ось ординат в точке $K_a N$.

В реальных условиях образцы, содержащие специфические КОБ, обычно содержат тот или иной уровень неспецифических КОБ, поэтому скэтчардовские графики связывания получаются часто нелинейными. В таких случаях для выделения вклада специфических КОБ в суммарное связывание гормона рассуждают следующим образом. Связывание гормона в системе, содержащей один специфический КОБ и неспецифические КОБ, может быть описано следующим уравнением:

$$b = K_{as} (N_s - b_s) u + K_{an} N_n u, \quad (III)$$

где индекс s означает специфическое связывание, а индекс n — неспецифическое. Величина $K_{as} (N_s - b_s) u = b_s$ не может превышать величины N_s . В то же время величина $K_{an} N_n u = b_n$ зависит лишь от концентрации свободного гормона u . Поэтому при достаточно больших добавках гормона в систему практически все связывание гормона белками будет определяться неспецифическими КОБ, т. е. $b = b_n = K_{an} N_n u$ или $b/u = b_n/u = K_{an} N_n = \text{const}$.

Теперь, подставляя найденное значение $K_{an} N_n$ в уравнение III, по разнице $b - K_{an} N_n u$ определяют величину b_s при низких концентрациях добавленного гормона. Откладывая величины b_s/u и b_s в координатах Скэтчарда, находят искомые величины K_{as} и N_s .

Эту же операцию выделения специфического связывания можно выполнить с помощью графических построений (рис. 182, Б). Для этого прежде всего строят скэтчардовский график для суммарного связывания гормона. Затем проводят прямую CD , параллельную оси абсцисс, пересекающую ось ординат в точке $K_{an} N_n$. Каждую экспериментальную точку A_i соединяют прямой с началом координат O . Находят точки пересечения B_i прямых OA_i с прямой CD . Из точек A_i на прямых OA_i откладывают отрезки OB_i . Через полученные точки E_i проводят прямую, пересекающую ось абсцисс в точке, равной N_s , и ось ординат в точке, равной $K_{as} N_s$.

К важнейшим характеристикам КОБ относится избирательность их сродства к лигандам или гормональная специфичность. Способность данного КОБ хорошо связывать одни соединения, но не связывать или связывать слабо другие может быть охарактеризована величинами K_a для соответствующих гормонов, измеренными описанным выше способом. На практике, однако, исследователь не всегда имеет возможность проводить прямое измерение связывания всех интересующих его соединений. Поэтому о способности изучаемого соединения взаимодействовать с данным КОБ часто судят по эффективности, с которой это соединение вытесняет другое гормональное соединение (связывание которого можно измерять непосредственно, например, по радиоактивности) из комплексов с КОБ.

Одним из способов оценки интенсивности взаимодействия лиганда с КОБ является измерение относительной конкурентоспособности данного лиганда по сравнению с конкурентоспособностью другого лиганда, связывание которого можно измерять по радиоактивности. При равновесии и условии, что концентрация радиоактивного гормона достаточно велика, относительная конкурентоспособность пропорциональна величине K_a . Относительную конкурентоспособность измеряют следующим образом. Сначала определяют долю связанного лиганда, связывание которого измеряют непосредственно (контрольный лиганд) при его возрастающих концентрациях. Долю связанного гормона при самой низкой его концентрации принимают за 100%. Затем в системе, содержащей самую низкую концентрацию меченого контрольного лиганда и возрастающие концентрации изучаемого соединения, также определяют степень связывания радиоактивного контрольного лиганда в процентах от степени связывания в отсутствие конкурента. Полученные величины откладывают в полулогарифмических координатах: по оси абсцисс в логарифмическом масштабе откладывают концентрацию конкурирующих лигандов, а по оси ординат — долю связанного меченого лиганда. Находят концентрации контрольного и исследуемого лигандов, при которых количество связанного радиоактивного лиганда снижается на 50%. Искомую величину

ну относительной конкурентоспособности исследуемого лиганда получают из отношения

$$\frac{\text{концентрация контрольного лиганда при 50\%-ном ингибировании}}{\text{концентрация исследуемого лиганда при 50\%-ном ингибировании}} \cdot 100\%.$$

Методы определения связывания. Удобным для анализа взаимодействия гормонов с КОБ оказалось использование гормонов, в состав которых введен радиоактивный изотоп. Наиболее часто используют изотопы иода ^{125}I (для пептидных и тиреоидных гормонов), углерода ^{14}C и водорода ^3H (для стероидных гормонов). Удельная радиоактивность гормонов, меченых ^3H и ^{125}I , достигает 100 Ки/ммоль и более.

После того как КОБ свяжет часть гормона, отделяют связанную фракцию гормона от свободной. Для этого используют различия в физико-химических свойствах свободного гормона и гормона, связанного с КОБ: в их размерах, зарядах, способности сорбироваться различными адсорбентами и т. д. Наиболее распространенными способами разделения свободного и связанного гормона являются равновесный диализ, гельфильтрация, ионообменная хроматография, электрофорез, осаждение сульфатом аммония, адсорбция на активированном угле и на различных силикатах, а в случае радиоиммунологических методов — двойная иммунопреципитация, разделение с помощью антисыворотки, фиксированной на твердой фазе. Требования, предъявляемые к методам разделения свободного и связанного белками гормона, в зависимости от того, изучается ли КОБ или определяется содержание гормона, различны. При измерении содержания гормонов с помощью СА желательно наиболее полно отделить гормон, связанный специфическим КОБ, не только от свободного гормона, но и от комплексов с неспецифическими КОБ. При измерении же параметров взаимодействия гормонов с КОБ такое отделение крайне нежелательно, поскольку для определения таких параметров, как K_{as} и N_s , необходимо точно знать концентрацию свободного гормона.

Образование комплексов гормона со специфическим КОБ является обратимым процессом. Поэтому при использовании неравновесных методов разделения часть комплексов гормонов с КОБ в процессе разделения может распадаться, что должно приводить к некоторому искажению определяемых величин K_{as} и N_s . Для СА это не имеет существенного значения. После разделения свободного и связанного КОБ гормона определяют содержание радиоактивности в связанной КОБ или несвязанной фракции гормона. Для измерения радиоактивности нодированных соединений используют счетчики жесткого излучения (гамма-спектрометры); для измерения радиоактивности соединений, меченых ^{14}C или ^3H , используют жидкостно-сцинтилляционные счетчики.

Принцип сатурационного анализа. Термином «сатурационный анализ» (СА), или «конкурентный белковосвязывающий анализ», обозначают определение различных веществ, основанное на эффекте конкуренции определяемого соединения и индикаторных количеств одноименного (или очень близкого по структуре) меченого соединения за одни и те же связывающие участки специфического КОБ. Количественное определение веществ таким методом оказывается возможным благодаря ограниченной емкости, высокому сродству и выраженной избирательности сродства специфических КОБ к данному соединению. Чем выше сродство КОБ к лиганду, тем более чувствителен метод определения данного лиганда (чувствительность метода — минимальное количество лиганда, вызывающее достоверное снижение количества связанного с КОБ меченого лиганда). Чрезвычайно важное значение для выбора той или иной схемы СА имеет избирательность или специфичность сродства КОБ, которая обычно тем выше, чем выше K_d данного КОБ для исследуемого лиганда. Если известно, что уровень лиганда в исследуемом материале сравнительно невелик, а содержание родственных ему соединений значительно, то следует либо ввести в схему процедуру очистки данного лиганда (например, с помощью хроматографии), либо подобрать КОБ, который связывает исключительно данный лиганд. Как правило, рецепторные и особенно иммунные КОБ обладают большим сродством к гормонам. Для СА используют те же методы разделения свободного и связанного гормона, что и при изучении связывающих характеристик КОБ. Анализ результатов СА сводит-

ся к построению стандартной кривой, т. е. зависимости количества связанного КОБ меченого лиганда от концентрации в системе немеченого лиганда, и нахождения по ней концентрации лиганда в исследуемом материале.

Задача 1. Изучение основных гормонсвязывающих характеристик специфических транспортных белков плазмы крови

Цель работы. Измерить константы ассоциации, концентрации связывающих участков и гормональную специфичность сродства транспортных белков плазмы крови на примере α -фетопротейна сыворотки крови беременных крыс и сексстероидсвязывающего белка ретроплацентарной плазмы человека.

Варианты задачи. 1. Характеристика стероидсвязывающих свойств α -фетопротейна крысы с использованием ^3H -эстрадиола. 2. Характеристика стероидсвязывающих свойств сексстероидсвязывающего белка человека с использованием ^3H -тестостерона. 3. Характеристика стероидсвязывающих свойств сексстероидсвязывающего белка человека с использованием ^3H -эстрадиола.

Методика. Оборудование. Жидкостно-сцинтилляционный счетчик типа Magk-2, «Nuclear Chicago»; центрифуга с охлаждением типа ЦЛР-1, источник сжатого азота или воздуха; автоматические пипетки или пипетки с микровинтом; лабораторная посуда; кюветы со льдом.

Реактивы. ^3H -эстрадиол и ^3H -тестостерон с удельной радиоактивностью 40—100 Ки/ммоль; растворы кристаллических препаратов эстрона (E_1) эстрадиола (E_2), тестостерона (T), 5α -дигидротестостерона, прогестерона, кортикостерона в смеси бензол-этанол 9:1 с концентрацией 100 мкг/мл; буферный раствор: 10 мМ трис-НСI pH 7,5—10 мМ, KCl — 1,5 мМ ЭДТА, диоксановый сцинтиллятор (4 г PPO, 0,2 г POROP, 60 г нафталина, 100 мл метанола, 20 мл этиленгликоля, 800 мл диоксана); суспензия активированного угля, покрытого декстраном (2% норит А, 0,4% декстран — 80; 0,33% сахара в разведенном в 3 раза буфере).

Ход работы. 1. *Инкубация белка со стероидами.* Используя исходные растворы E_2 , E_1 и T , приготовить по 0,5 мл растворов этих стероидов с концентрациями 5, 10, 20 и 40 нг в 0,05 мл буфера. Разнести в центрифужные пробирки по 0,05 мл раствора ^3H - E_2 или ^3H - T и по 0,05 мл исследуемых стероидов в нужной концентрации (табл. 1, варианты 1, 2, 3). В отдельный флакон для счета радиоактивности внести 0,05 мл ^3H -стероида (контроль за внесением радиоактивности) и 1,0 мл буфера. Штатив с пробирками поместить в ледяную баню. Добавить в пробирки 1—30 по 1,0 мл буфера, 0,05 мл белкового раствора, а в пробирки 31—32 — по 1,1 мл буфера. Перемешать содержимое пробирок.

Пробирки 1—12 будут служить для измерения константы ассоциации K_a и концентрации связывающих участков N для ^3H -стероида и контролем при количественном определении гормональной специфичности сродства; пробирки 12—24 — для количественного определения конкурентоспособности E_2 , E_1 или T ; пробирки

Таблица 1. Состав инкубационной смеси для характеристики стероидсвязывающих свойств белков крови

Вариант 1 (α-фетопrotein)

Номера пробирок	$^3H-E_2$ мл	Бу-фер, мл	E_2 ¹		E_1		T		P		B		Сыво-ротка, мл
			мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	
1—2	0,05	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
3—4	0,05	1,0	0,05	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
5—6	0,05	1,0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
7—8	0,05	1,0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
9—10	0,05	1,0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
11—12	0,05	1,0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
13—14	0,05	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
15—16	0,05	1,0	0	0	0,05	5	0	0	0	0	0	0	0,05
17—18	0,05	1,0	0	0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0,05
19—20	0,05	1,0	0	0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0,05
21—22	0,05	1,0	0	0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0,05
23—24	0,05	1,0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0,05
25—26	0,05	1,0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0,05
27—28	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0,5	1000	0	0	0,05
29—30	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0,05
31—32	0,05	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05

¹ E_2 — эстрадиол, E_1 — эстрон, T — тестостерон, P — прогестерон, B — кортикостерон.

Таблица 1. Состав инкубационной смеси для характеристики стероидсвязывающих свойств белков крови

Вариант 2. (Сексстероидсвязывающий глобулин, связывание ^3H-T)

Номера пробирок	^3H-T , мл	Бу-фер, мл	T		E_2		DT ¹		P		B		Плаз-ма, мл
			мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	
1—2	0,05	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
3—4	0,05	1,0	0,05	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
5—6	0,05	1,0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
7—8	0,05	1,0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
9—10	0,05	1,0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
11—12	0,05	1,0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
13—14	0,05	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
15—16	0,05	1,0	0	0	0,05	5	0	0	0	0	0	0	0,05
17—18	0,05	1,0	0	0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0,05
19—20	0,05	1,0	0	0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0,05
21—22	0,05	1,0	0	0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0,05
23—24	0,05	1,0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0,05
25—26	0,05	1,0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0,05
27—28	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0	0,05
29—30	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0,05
31—32	0,05	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0,05

¹ DT — 5α-дигидротестостерон.

Таблица 1. Состав инкубационной смеси для характеристики стероидсвязывающих свойств белков крови

Вариант 3. (Сексстероидсвязывающий глобулин, связывание $^3\text{H-E}_2$)

Номера пробирок	$^3\text{H-E}_2$, мл	Бу-фер, мл	E_2		T		DT		P		B		Плаз-ма, мл
			мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	мл	нг	
1—2	0,00	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
3—4	0,05	1,0	0,05	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0,05
5—6	0,05	1,0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
7—8	0,05	1,0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
9—10	0,05	1,0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
11—12	0,05	1,0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
13—14	0,05	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05
15—16	0,05	1,0	0	0	0,05	5	0	0	0	0	0	0	0,05
17—18	0,05	1,0	0	0	0,05	10	0	0	0	0	0	0	0,05
19—20	0,05	1,0	0	0	0,05	20	0	0	0	0	0	0	0,05
21—22	0,05	1,0	0	0	0,05	40	0	0	0	0	0	0	0,05
23—24	0,05	1,0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0	0	0,05
25—26	0,05	1,0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0	0	0	0,05
27—28	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0	0	0,05
29—30	0,05	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	1000	0,05
31—32	0,05	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

25—26, 27—28, 29—30 — для качественного определения конкурентоспособности соответствующего соединения. Пробирки 31—32 — контролем на эффективность адсорбции ^3H -стероида углем.

2. Удаление несвязанных стероидов активированным углем и измерение радиоактивности. После инкубации проб на холоду в течение 1 ч добавить во все пробирки по 0,2 мл охлажденной суспензии активированного угля, покрытого декстраном. Одновременно перемешать содержимое всех пробирок. Инкубировать в ледяной бане 5 мин. Поместить пробирки в охлажденные вкладыши для центрифугирования. Центрифугировать с охлаждением 5 мин при 4000 об/мин. Осторожно (чтобы не взмутить уголь) отобрать во флаконы для счета радиоактивности по 1,0 мл супернатанта. Прилить во флаконы по 8 мл сцинтилляционной жидкости. Закрыть флаконы крышками и измерить содержание радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Обработка результатов.

Определение K_{as} и N_s проводят в порядке, указанном в табл. 2. Строят график Скэтчарда (b_s/u против b_s) и определяют величины N_s и $K_{as}N_s$. Рассчитывают концентрацию связывающих гормон участков в цельной сыворотке или плазме:

$$N_s \text{ (моль/л)} = N_s \text{ (нг)} \times \frac{10^{-9} \cdot 1,35 \cdot 10^3}{(\text{мол. масса стероида}) \times (\text{объем плазмы, мл})};$$

$$N_s \text{ (мкг \%)} = N_s \text{ (нг)} \times \frac{1,35 \cdot 100}{(\text{объем плазмы, мл}) \times 10^3}.$$

Определяют величину K_{as} ; для этого предварительно рассчитывают концентрацию связывающих гормон участков в инкубационной смеси (до добавления угля):

$$N_s \text{ (моль/л)} = N_s \text{ (нг)} \times \frac{10^9 \cdot 1,35 \cdot 10^3}{(\text{мол. масса стероида}) \times (\text{объем инкубационной смеси})};$$

$$K_{as} \text{ (л/моль)} = \frac{K_{as} N_s}{N_s \text{ в инкубационной смеси, моль/л}}.$$

Таблица 2. Порядок расчетов для измерения K_{as} и N_s

Номера пробирок, 1—14	b , имп/мин	u , имп/мин	b_n , имп/мин	b_s , имп/мин	b_s/u	Внесено суммарно стероида (t), нг/мл	b_s , нг

Примечания. Обозначим количество внесенной радиоактивности l (имп/мин). $u = l - b$. $b_n = u \cdot (b/u)_n$, где $(b/u)_n$ — отношение b/u для пробирок 13—14. Количество суммарно внесенного стероида = (количество внесенного ^3H -стероида) + (количество внесенного немеченого стероида). Учесть долю отбираемой для измерения радиоактивности аликвоты образца! Пересчет количества ^3H -стероида из размерности имп/мин в нанограммы проводят на основе данных об удельной радиоактивности ^3H -стероида. Используют равенство $1\text{Ки} = 2,22 \cdot 10^{12}$ распадов/мин. Эффективность счета принимают равной 25%. $b_s(\text{нг}) = b_s(\text{имп/мин}) \cdot t/l$.

Определение гормональной специфичности сродства КОБ. Рассчитывают количество связанного ^3H -стероида в пробирках 3—30, принимая за 100% количество связанного ^3H -стероида в пробирках 1—2.

Рассчитывают концентрацию конкурирующих соединений (моль/л):

$$\frac{(\text{количество конкурирующего соединения, нг}) \cdot 10^{-9} \cdot 10^3}{(\text{мол. масса конкурирующего соединения}) \cdot (\text{объем инкубационной смеси, мл})}.$$

Строят график зависимости процента связывания ^3H -стероида от логарифма концентрации конкурирующего соединения. Определяют относительную конкурентоспособность исследуемого соединения в процентах от конкурентоспособности контрольного соединения по 50%-ному ингибированию связывания ^3H -стероида (контрольное соединение — гормон, одноименный с ^3H -стероидом).

Рекомендуемая литература: [54]; [56].

Задача 2. Определение кортикостерона в сыворотке крови крыс методом сатурационного анализа с использованием транскортина (по методу Мерфи в модификации, разработанной в лаборатории эндокринологии МГУ)

Цель работы. Определить концентрацию кортикостерона в сыворотке крови у разных групп животных.

Методика. Исследуют сыворотку крови интактных самцов, самок и гипофизэктомированных и стрессированных самок крыс.

Оборудование. Оборудование то же, что в задаче 1.

Реактивы. ^3H -кортикостерон ($^3\text{H-B}$) с удельной радиоактивностью около 40 Ки/ммоль; раствор кристаллического препарата кортикостерона в смеси бензол-этанол 9:1 с концентрацией 100 мкг/мл; 10 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,4; диоксанный сцинтиллятор (см. задачу 1); суспензия активированного угля, покрытого декстраном (см. задачу 1); метиленхлорид; ретроплацентарная плазма человека, из которой предварительно удалены стероиды (к разведенной в 2 раза натрий-фосфатным буфером ретроплацентарной плазме добавляют равный объем суспензии активированного угля и инкубируют 15 мин при 40°C; уголь осаждают центрифугированием; супернатант разводят в 2,5 раза натрий-фосфатным буфером; хранят при -10°C).

Ход работы. 1. Приготовление тестирующей плазмы. Проводить этот этап одновременно с этапом 2. Разморозить в теплой воде (40°C) 14,3 мл 10%-ной ретроплацентарной бесстероидной плазмы. Внести в колбу объемом 50 мл $^3\text{H-B}$ из расчета 20 000 имп/мин на пробу (42 пробы). Выпарить растворитель под струей воздуха или азота. Добавить 14,0 мл натрий-фосфатного буфера и перемешивать при 40°C 5 мин для растворения $^3\text{H-B}$. Перелить содержимое в другую колбу. Повторить процедуру растворения $^3\text{H-B}$. В ту же колбу добавить размороженную ретроплацентарную плазму. Отобрать 1 мл во флакон для счета (контроль на внесение радиоактивности).

2. Экстракция стероидов из исследуемой сыворотки. Отобрать в пробирки по 0,05 мл сыворотки интактных самок, по 0,1 мл сыворотки интактных самцов, по 0,025 мл сыворотки стрессированных самок и по 0,1 мл сыворотки гипофизэктомированных самок крыс (по 2 параллельные пробы). Добавить во все пробирки и в две пустые, которые будут использованы для определения блэнков¹, по 1 мл метиленхлорида. Встряхивать в течение 5 мин. После 3-минутного отстаивания осторожно перелить метиленхлоридный экстракт в центрифужные пробирки. Упарить растворитель под током воздуха или азота при 40°C. Процедуру экстракции и выпаривание повторить.

¹ Блэнк — содержание в растворителе, используемом для экстракции стероидов, веществ, снижающих уровень связывания ^3H -стероида. Величину блэнка выражают количеством стероида, вызывающим такое же снижение связывания ^3H -стероида, как и сухой остаток растворителя.

3. *Инкубация тестирующей плазмы с гормоном.* В чистые центрифужные пробирки внести необходимое количество стандартного раствора кортикостерона (см. табл. 3). Растворитель выпарить под током воздуха. Добавить во все пробирки (со стандартом кортикостерона и с экстрактами сыворотки) по 1 мл тестирующей плазмы, содержащей $^3\text{H-B}$. Встряхивать пробы в течение 5 мин при комнатной температуре для растворения сухого экстракта, затем еще 5 мин при 40°C для уравнивания всех фракций гормона. После этого инкубацию продолжить при комнатной температуре 5 мин и при $0-4^\circ\text{C}$ 30 мин.

4. *Удаление несвязанных стероидов активированным углем.* При $0-4^\circ\text{C}$ тщательно перемешать суспензию активированного угля, покрытого декстраном. Добавить во все пробирки по 0,2 мл суспензии угля, после чего штатив с пробирками несколько раз интенсивно встряхнуть. Пробы инкубировать с углем 15 мин при $0-4^\circ\text{C}$. Отцентрифугировать пробы при 4500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант осторожно (чтобы не взмутить уголь!) перелить во флаконы для счета радиоактивности.

5. *Измерение радиоактивности.* Добавить во флаконы для счета по 8 мл сцинтилляционной жидкости. Измерить содержание радиоактивности в пробах на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Обработка результатов. Строят графики зависимости содержания связанного $^3\text{H-B}$ от количества добавленного в пробу немеченого B . Количество связанного $^3\text{H-B}$ выражают в имп/мин и в % от внесенного в пробы $^3\text{H-B}$. Определяют по этим графикам содержание B в различных образцах сыворотки. Полученные величины выражают в $\text{мкг}\%$; в нг/мл ; в моль/л . При расчетах учитывают величины блэнков.

Таблица 3. Состав инкубационной смеси для определения кортикостерона в плазме крыс

Номера пробирок	B		Экстракт сыворотки	Тестирующая плазма с $^3\text{H-B}$, мл
	мл	нг		
1, 2	0	0	—	1
3, 4	0,02	10	—	1
5, 6	0,04	20	—	1
7, 8	0,06	30	—	1
9, 10	0,08	40	—	1
11, 12	0	0	a^1	1
13, 14	0	0	b^1	1
15, 16	0	0	v^1	1
17, 18	0	0	$г^1$	1
19, 20	0	0	$д^1$	1

¹ $a, b, v, г$ — соответственно экстракты сыворотки крови интактных самок, интактных самок, гипофизэктомированных самок и стрессированных самок крыс; $д$ — сухой остаток растворителя для определения блэнка.

Рекомендуемая литература: [55].

Задача 3. Определение содержания эстрадиола в плазме крови человека радиоиммунологическим методом¹

Методика. Исследуют плазму крови здоровых мужчин и женщин, ретроплацентарную плазму беременных женщин. **Оборудование.** Оборудование то же, что в задаче 1. **Реактивы.** Стандартный набор kit для радиоиммунологического определения E_2 фирмы Sorin, дистиллированная вода.

Ход работы. 1. *Подготовка реагентов из стандартного набора.* Набор реагентов для радиоиммунологического определения E_2 хранить при 2—8°C. После подготовки реагентов к работе использовать их в тот же день. В набор входят $^3H-E_2$, стандартная навеска E_2 (400 нг) в 1 мл этанола, лиофилизированная кроличья антисыворотка к E_2 , смесь солей для приготовления фосфатного буфера и активированный уголь, покрытый декстраном. Растворить смесь солей для буфера в 200 мл дистиллированной воды. Добавить 10 мл буфера в сосуд с $^3H-E_2$. Отобрать из сосуда со стандартной навеской E_2 0,1 мл раствора и добавить к этой аликвоте 9,9 мл буфера. Концентрация E_2 в этом растворе составляет 4,0 нг/мл. Последовательно разводя этот раствор буфером, приготовить растворы с концентрацией E_2 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 и 0,125 нг/мл. Добавить 10 мл дистиллированной воды в сосуд с антисывороткой. Суспендировать активированный уголь, покрытый декстраном, в 60 мл буфера.

2. *Экстракция стероидов из исследуемой плазмы.* Внести в центрифужные пробирки по 0,3 мл исследуемой плазмы. Добавить по 3 мл этилового эфира (наркозного). Заккрыть пробирки полиэтиленовыми пробками и интенсивно встряхивать в течение 10 мин. Отцентрифугировать пробы в течение 5 мин при 3000 об/мин. Отобрать аликвоты экстракта в центрифужные пробирки (см. табл. 4). Выпарить растворитель под струей воздуха. Одновременно с экстракцией стероидов из плазмы проводится определение степени экстракции гормона. Для этого 0,2 мл раствора $^3H-E_2$ добавить в пробирку с 1 мл плазмы. Инкубировать 30 мин при 30—40°C (для смешивания пулов $^3H-E_2$ и эндогенного E_2). Отобрать две аликвоты по 0,1 мл во флаконы для счета. Перенести две аликвоты по 0,3 мл в пробирки для экстракции. Экстрагировать эфиром, как описано выше. Перенести две аликвоты по 1 мл экстракта во флаконы для счета, выпарить растворитель и добавить по 0,1 мл плазмы.

По соотношению содержания радиоактивности в пробах, не экстрагированных эфиром, и в эфирных экстрактах рассчитать выход гормона при экстракции.

3. *Инкубация стероидов с антисывороткой.* Внести в центрифужные пробирки $^3H-E_2$, стандартные количества E_2 или выпаренный экстракт исследуемой плазмы, буфер и антисыворотку в коли-

¹ Разработка составлена по материалам, прилагающимся к наборам kit фирмы Sorin.

чествах, указанных в табл. 4. Пробирки 1—14 будут служить для построения стандартной кривой, пробирки 15—20 — для определения уровня E_2 в плазме крови, пробирки 21, 22 — для измерения блэнков, пробирки 23, 24 — для определения количества внесенного $^3H-E_2$. Перемешать содержимое пробирок и инкубировать 30 мин при $37^\circ C$ для создания одинаковых условий при последующем комплексировании с антителами разных фракций гормона. Поместить пробирки в ледяную баню и инкубировать в течение 2 ч.

4. Удаление несвязанных стероидов активированным углем и измерение радиоактивности. Добавить в пробирки 1—22 по 0,5 мл суспензии активированного угля, покрытого декстраном, предварительно тщательно перемешав эту суспензию. Интенсивно встряхнуть пробирки и инкубировать в ледяной бане 10 мин. Отцентрифугировать пробы при 4000 об/мин в течение 10 мин. Отобрать во флаконы для счета по 0,5 мл супернатанта. Прилить во все флаконы по 10 мл сцинтилляционной жидкости и измерить содержание радиоактивности на жидкостно-сцинтилляционном счетчике.

Обработка результатов. Строят стандартную кривую зависимости количества связанного $^3H-E_2$ от количества внесенного в систему E_2 . За 100% принимают уровень связанного $^3H-E_2$ в отсутствие E_2 . Определяют по кривой количество E_2 в экстрактах плазмы. С учетом выхода стероида при экстракции, количества плазмы, использованной для экстракции, количества отобранного экстракта и величины блэнка рассчитывают содержание E_2 в пг/мл, нг% и моль/л.

Таблица 4. Состав инкубационной смеси для определения эстрадиола радиоиммунологическим методом

Номера пробирок	$^3H-E_2$, мл	E_2		Буфер, мл	Антисыворотка, мл	Сухой экстракт
		мл	пг			
1	2	3	4	5	6	7
1, 2	0,1	0	0	0,3	0,1	—
3, 4	0,1	0,1	12,5	0,2	0,1	—
5, 6	0,1	0,1	25	0,2	0,1	—
7, 8	0,1	0,1	50	0,2	0,1	—
9, 10	0,1	0,1	100	0,2	0,1	—
11, 12	0,1	0,1	200	0,2	0,1	—
13, 14	0,1	0,1	400	0,2	0,1	—
15, 16	0,1	0	0	0,3	0,1	а ¹
17, 18	0,1	0	0	0,3	0,1	б ¹
19, 20	0,1	0	0	0,3	0,1	в ¹
21, 22	0,1	0	0	0,3	0,1	г ¹
23, 24	0,1	0	0	0,9	0	—

¹ а, б, в, г — соответственно экстракты плазмы крови мужчин (2 мл); плазмы крови женщин (1 мл), ретроплацентарной крови (0,1 мл) и сухой остаток после выпаривания раствора (2 мл).

Рекомендуемая литература: [36].

Раздел VIII

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Жидкое состояние циркулирующей крови и ее свертывание обеспечиваются функциональным взаимодействием двух систем организма: *противосвертывающей и свертывающей*. Учение о противосвертывающей системе сформулировано и экспериментально обосновано Б. А. Кудряшовым и сотр. (1958).

Свертывающая система обеспечивает защиту от кровопотери при нарушении целостности кровеносных сосудов, противосвертывающая и фибринолитическая — поддерживают жидкое состояние крови, предохраняя ее от свертывания. Степень реактивности этих систем определяется состоянием: *сосудистой стенки, форменных элементов крови* (в первую очередь специализированных клеток тромбоцитов или кровяных пластинок) и *белков плазмы крови*. Она зависит также от реологических свойств крови, протекающей с различной скоростью через сосуды разного диаметра.

В нормально функционирующем организме жидкое состояние крови в значительной степени объясняется взаимной резистентностью сосудистой стенки, тромбоцитов и свертывающих белков плазмы крови, представленных предшественниками сериновых протеолитических ферментов или неактивными комплексами ферментов с ингибиторами. Эта взаимная резистентность трех компонентов обеспечивается многообразными *регуляторными механизмами*, которые препятствуют постоянно действующим внешним и внутренним стимулам, способным ее нарушить. Аномалии в механизмах регуляции при патологии приводят к *тромбозу* и (или) *геморрагии*.

ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОНЕНТОВ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Сосудистая стенка и тромбоциты. Монослой эндотелиальных клеток, расположенный на внутренней поверхности сосудистой стенки, служит барьером между кровью и ее соединительнотканными элементами (рис. 183). Нарушение целостности эндотелиального слоя приводит к контакту крови с поверхностью фибриллярного коллагена, что инициирует образование гемостатического тромбоцитарного тромба. Чем глубже ранение сосуда, тем более выражен *гемостаз*, ибо в процесс включаются более активные, тромбогенные формы коллагена — *интимы и адвентиции*. Тромбоциты «приклеиваются» к коллагену субэндотелия, т. е. *адгезируют* на его поверхности. Одновременно происходит их *агрегация*, склеивание друг с другом. При адгезии и агрегации тромбоциты меняют форму, превращаясь из дисков в сферы, происходит высвобождение содержащихся в них ионов Ca^{2+} и K^{+} , белков и физиологически активных соединений (адреналин, серотонин, тромбоксан A_2), индуцирующих дальнейшую агрегацию тромбоцитов и оказывающих вазоконстрикторное действие, что особенно существенно для остановки кровотоков из мелких сосудов. Белки (факторы V, VIII, XIII и др.) усиливают свертывание плазмы крови. Поверхность «активированных» тромбоцитов в результате перераспределения зарядов в отдельных участках двойного фосфолипидного слоя плазменной мембраны приобретает отрицательный заряд. Она, так же как и отрицательно заряженная поверхность коллагена субэндотелия, представляет собой каталитическую поверхность, на которой происходит *каскад реакций плазменных белков свертывания крови* (рис. 184). Каскад свертывания завершается образованием фермента *тромбина*, превращающего растворенный в плазме крови *фибриноген* в фибриновый сгусток, который составляет

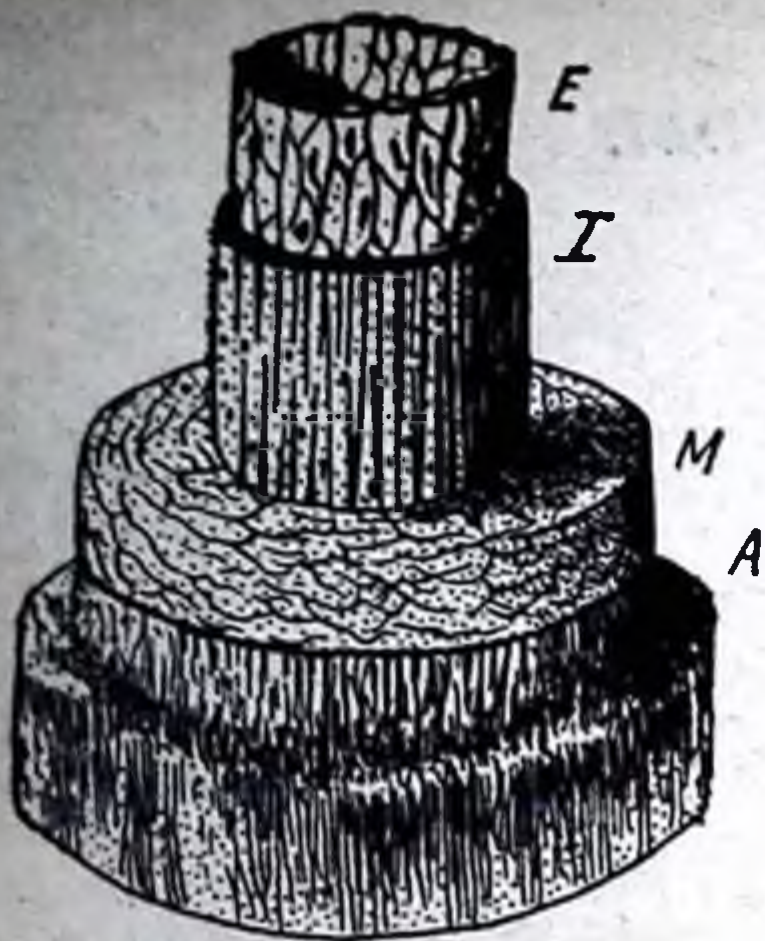


Рис. 183. Стенка аорты:

Е — монослой эндотелиальных клеток, I — внутренний слой intima, M — средний слой media, A — внешний слой adventitiae

основу тромба. Одновременно активируется фибринолитическая система, обеспечивающая растворение тромба по мере заживления раны.

Неповрежденный эндотелий сосудистой стенки обладает *атромбогенными* свойствами, определяющимися прежде всего способностью синтезировать и секретировать мощный ингибитор агрегации тромбоцитов — *простагландин* (рис. 185). Интима и адвентиция в значительно меньшей степени синтезируют это соединение.

Тромбоциты — непигментированные безъядерные клетки крови, образующиеся из мегакариоцитов костного мозга. Они содержат структурные элементы, характерные для большинства других клеток (рис. 186). Способность к агрегации — универсальное свойство тромбоцитов. Агрегация осуществляется в результате воздействия индукторов агрегации: АДФ, тромбина, коллагена, фибрина и др. рецепторами этих соединений являются гликопротеиды мембран тромбоцитов. Существуют различные механизмы, обеспечивающие связывание тромбоцитов в агрегаты. Одним из

важнейших посредников агрегации выступает фибриноген, который содержится в гранулах тромбоцитов и секретируется при *реакции высвобождения* тромбоцитов вместе с другими веществами. Полагают, что участие фибриногена в образовании гемостатической тромбоцитарной пробки важнее, чем участие в образовании фибринового сгустка.

Белки плазмы крови. Большинство белков, участвующих в свертывании крови, называются *факторами свертывания* и обозначаются римскими цифрами. Порядок обозначения обусловлен исторической последовательностью их открытия. Буквой «а» обозначают активные формы факторов свертывания, в большинстве своем представляющие *сериновые протеолитические ферменты*. Основные характеристики неактивных и активных форм белков плазмы крови отражены в таблице.

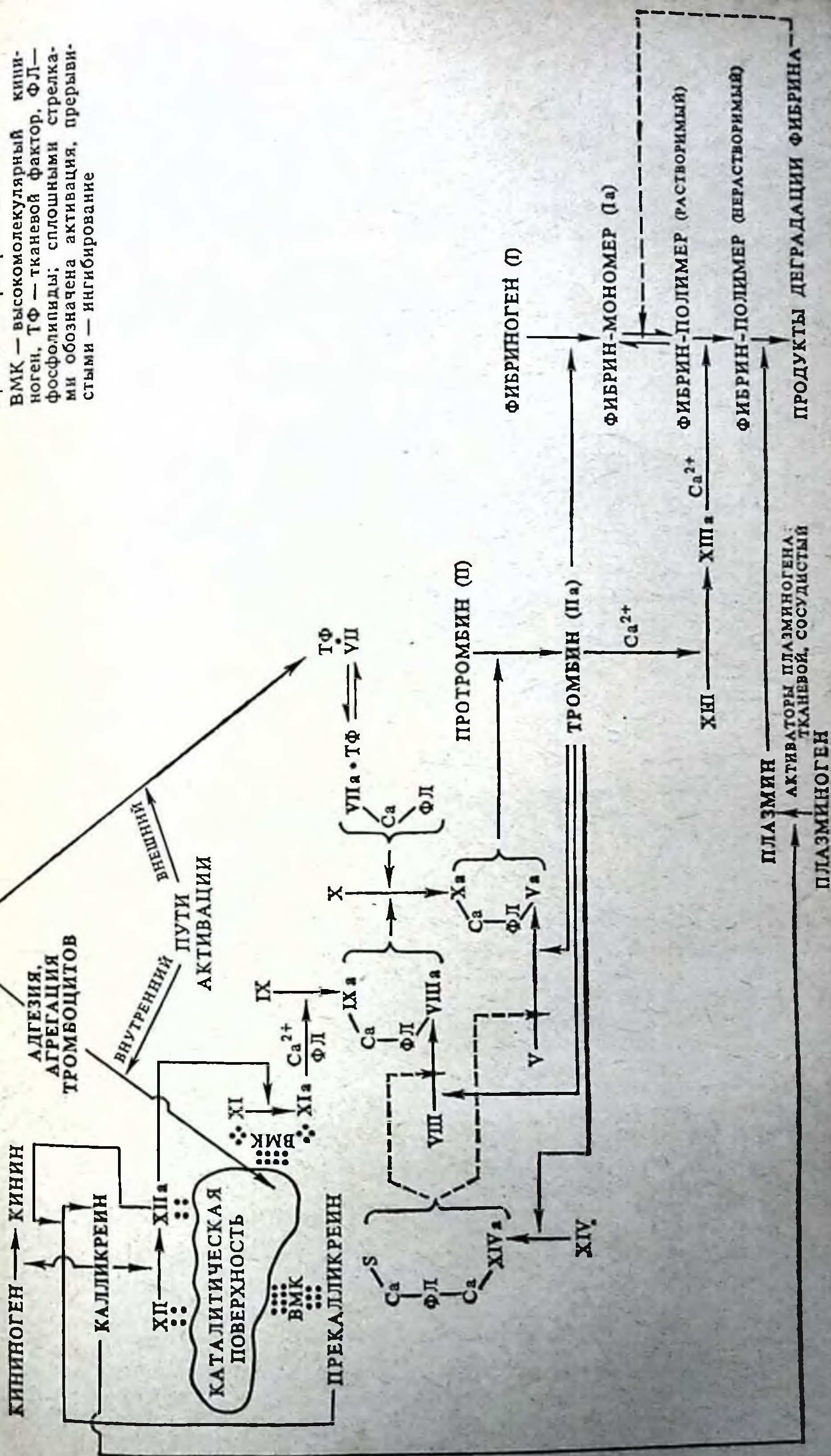
Включение системы свертывания представляет серию последовательно протекающих событий — *каскад биохимических реакций*, в котором каждое последующее звено зависит от предыдущего. Активные формы факторов способны активировать неактивную форму следующего в цепи реакций фактора, вызывая ограниченный протеолиз двух — четырех пептидных связей (см. рис. 184, рис. 187). Биологический смысл каскада ферментативных реакций состоит в том, что события в нем развиваются с самоускорением: каждая следующая стадия происходит значительно быстрее, чем предыдущая. Иными словами, в каскадных реакциях достигается значительное усиление *первичного сигнала*.

При нарушении целостности кровеносных сосудов отрицательно заряженная поверхность коллагена субэндотелия также, как поверхность активированных тромбоцитов, является высокоаффинной для ряда белков свертывания крови, и в первую очередь для ф. XII и высокомолекулярного кининогена (ВМК), находящегося в комплексе с прекалликреином и ф. XI. Спонтанно активированный на поверхности ф. XIIa стимулирует образование фермента *калликреина*, который по принципу положительной обратной связи усиливает активацию ф. XII. Аналогичное действие оказывает *плазмин*. Ф. XIIa активирует ф. XI. Образованием ф. XIa завершается *контактная стадия* свертывания крови (см. тему II). Ф. XIa стимулирует активацию ф. IX, который превращает ф. X в ф. Xa (*внутренний механизм свертывания крови*). При глубоком повреждении сосудистой стенки и окружающих тканей, а также под действием адреналина и при некоторых патологических состояниях в кровоток поступают тромбопластические вещества, представляющие комплекс белка — тканевого фактора с фосфолипидом. Они активируют ф. VII, который превращает ф. X в ф. Xa (*внешний меха-*

ПОВРЕЖДЕНИЕ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

Рис. 184. Схема свертывания крови и фибринолиза:

ВМК — высокомолекулярный кининоген, ТФ — тканевой фактор, ФЛ — фосфолипиды; сплошными стрелками обозначена активация, прерывистыми — ингибирование



низм свертывания крови) (см. рис. 184). Ф. Ха представляет собой физиологиче-
 ский активатор протромбина; превращение последнего в тромбин и далее фиб-
 риногена в фибрин является *общим путем* для внешнего и внутреннего механизмов
 свертывания. Хотя деление на внешний и внутренний механизмы условно
 (ф. VII активируется также ф. IXа и ф. XIIа, в то же время ф. IX может акти-
 вироваться ф. VIIа в присутствии тканевого фактора), однако только 10% про-
 тромбина превращается в тромбин за счет активации внутреннего механизма.
 Более полная активация ф. X происходит под действием внешних активаторов.
 Детально об активации протромбина см. тему III; превращение фибриногена в
 фибрин и стабилизация фибринового сгустка рассмотрены в теме IV.

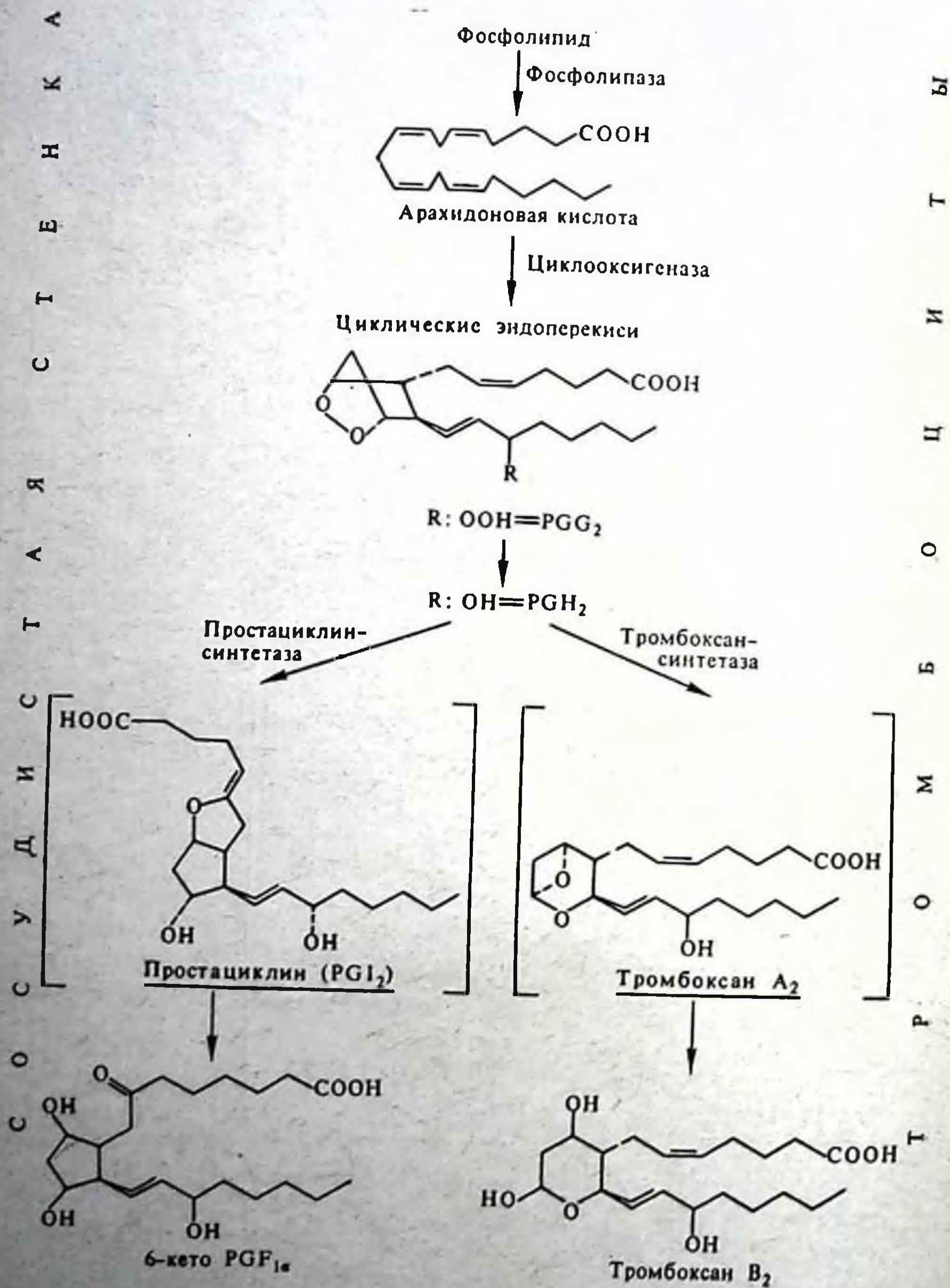


Рис. 185. Метаболизм фосфолипидов, направленный на образование нестабильных аналогов простагландинов, простациклина в сосудистой стенке и тромбоксана A_2 в тромбоцитах (по R. M. Hardisty, 1982)

Из рис. 184 видно, что необходимым компонентом гемостатического процесса является отрицательно заряженная поверхность фосфолипидов. Связывание с этой поверхностью — важный способ концентрирования белков свертывания крови. В этом процессе участвуют N-концевые области белков-факторов XII, XI, IX, VII, X, II. При активации их в ферменты N-концевая и C-концевая области (в последней локализован остаток серина активного центра) остаются соединенными дисульфидными мостиками (см. рис. 187), т. е. ферменты оказываются связанными с поверхностью вблизи соответствующих субстратов. Только тромбин, для которого концентрация субстрата, фибриногена, в крови исключительно высокая (табл.) лишается специфических участков связывания с каталитической поверхностью.

Не менее важная роль принадлежит регуляторным белкам, ускоряющим реакции, которые приводят к образованию тромбина (ВМК, тканевой ф., факторы V и VIII) или замедляют их (белок S) (см. рис. 184, табл.).

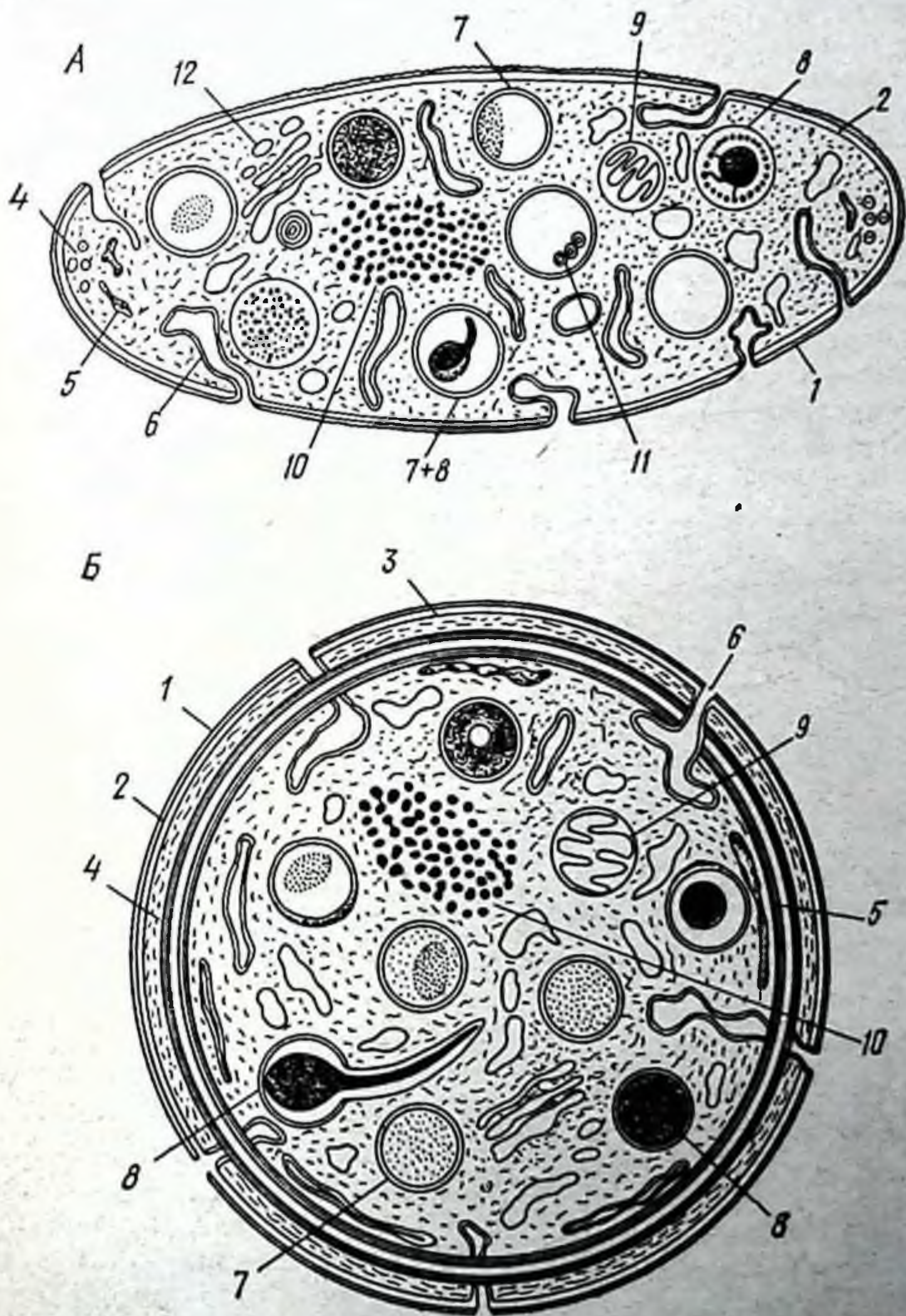


Рис. 186. Тромбоцит в дискоидном (А) и экваториальном (Б) разрезах (по R. M. Hardisty, 1982):

1 — внешняя оболочка, 2 — клеточная мембрана, 3 — субмембранный микрофиламент, 4 — микротрубочки, 5 — плотные трубочки, 6 — элементы открытой канальной системы, 7 — α-гранулы, 8 — плотные гранулы, 9 — митохондрии, 10 — гликоген, 11 — трубочки внутри α-гранул, 12 — аппарат Гольджи

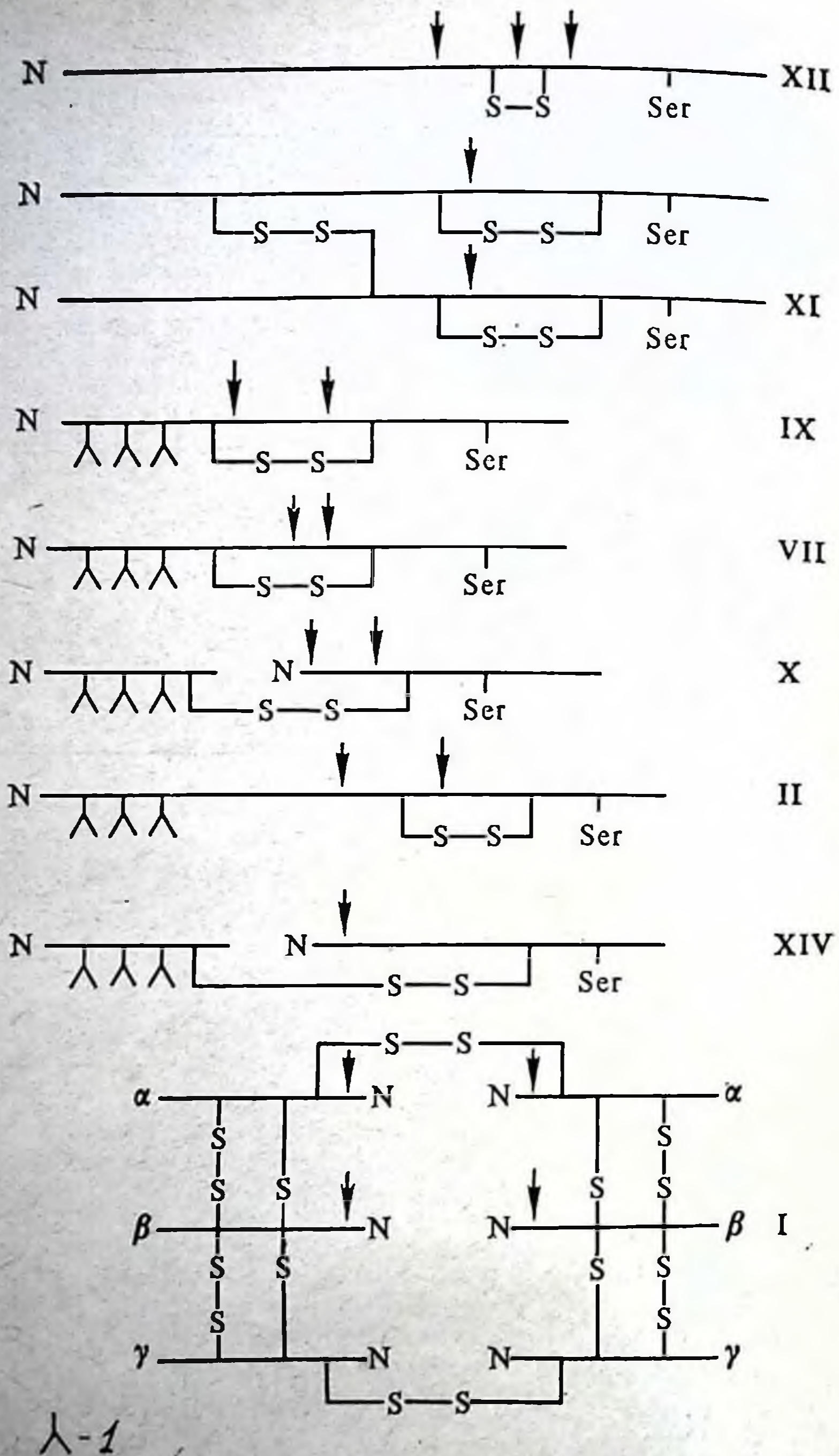


Рис. 187. Линейные структуры факторов свертывания крови (I—XIV). Стрелками обозначены места ограниченного протеолиза, приводящего к образованию активных факторов свертывания:

Ser — локализация серинового активного центра; / — остаток γ -карбоксиглутаминовой кислоты

Реакции каскада свертывания контролируются *ингибиторами*. Среди них исключительное значение имеет *гепарин*, ускоряющий действие антитромбинов. Ингибиторы не проявляют высокой избирательности в отношении протеаз плазмы крови, с которыми они образуют стехиометрические (1:1) довольно прочные комплексы. Исключение составляет α_2 -макроглобулин, образующий с протеазой комплекс, включающий две молекулы фермента (см. табл.).

РЕГУЛЯЦИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Регуляция свертывания крови осуществляется различными путями: на биохимическом и клеточном уровне и при участии нейрогормональных механизмов.

Биохимическая регуляция. Этот вид регуляции проявляется прежде всего в виде системы положительных и отрицательных обратных связей каскада биохимических реакций, направленных на образование тромбина. Определяющим моментом такой регуляции является *порог концентраций реагирующих соединений*. Тромбин, возникающий в результате активации протромбина, способен повышать кофакторные свойства регуляторных белков, ф. V и VIII путем ограниченного протеолиза их молекул, усиливая активацию ф. X и протромбина. При достаточно высоком уровне тромбина в крови, превышающем ингибиторный потенциал антитромбинов, тромбин сам ограничивает собственную активацию тем, что вызывает дальнейший протеолиз ф. Va и VIIIa, снижая их кофакторную способность, и активирует фактор XIV. Ф. XIVa гидролизует белки ф. V, Va, VIII и VIIIa (см. рис. 184) и стимулирует фибринолиз. Тромбин, инактивируется эндотелиальными клетками путем иммобилизации на их поверхности через посредство белка тромбомодулина. При этом он лишается свертывающей активности, но резко увеличивает способность активировать фактор XIV плазмы крови.

Проявлением биохимической регуляции на клеточном уровне является регуляция тромбоцитарно-сосудистого гемостаза. Тромбоксан A_2 индуцирует агрегацию тромбоцитов, а простаглицлин эндотелия ингибирует их агрегацию (см. рис. 185). Регуляция агрегации тромбоцитов опосредуется этими двумя соединениями через их действие на аденилат-циклазу тромбоцитов. Простаглицлин стимулирует аденилат-циклазу и повышает уровень циклического АМФ (ц-АМФ), в то время как тромбоксан A_2 подавляет повышение ц-АМФ. В месте повреждения сосудистой стенки, лишенном слоя эндотелиальных клеток, резко снижен биосинтез и секреция простаглицлина, и тромбоциты беспрепятственно контактируют с компонентами субэндотелия. Это приводит к активации фосфолипазы мембран тромбоцитов, образованию тромбоксана A_2 и, следовательно, усилению агрегации на поверхности дезэндотелизированной сосудистой стенки.

Нейрогуморальная регуляция. Свертывание крови, как любой физиологический процесс, находится под контролем нейрогуморальной регуляции. Этот контроль осуществляется при непосредственном участии ферментов, гормонов, медиаторов и других физиологически активных веществ, модулирующих ключевые реакции, которые определяют состояние тромбоцитов, сосудистой стенки и превращения плазменных белков, компонентов свертывающей и противосвертывающей систем крови.

Изменения химического состава крови воспринимаются рецепторами сосудистой стенки и по афферентным путям передаются в ретикулярную формацию, отсюда нисходящие импульсы направляются к эффекторным органам. Именно в ретикулярной формации происходит интеграция вегетативных функций и процесса свертывания крови. Процесс свертывания крови регулируется также условно-рефлекторным путем.

Рефлекторно-гуморальная регуляция как свертывания крови, так и поддержания ее жидкого состояния осуществляется парасимпатическим и симпатическим отделами вегетативной нервной системы, а также системой гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. Конечный результат действия симпатической нервной системы обеспечивает преимущественно свертывающий эффект, парасимпатической — противосвертывающий. На начальных этапах гемостаза симпатическая нервная система участвует в защитной реакции организма от кровопотери, обеспечивая повышение свертывания крови. В период ограничения тромбообразования и начала лизиса тромба парасимпатическая нервная система осуществляет противосвертывающий эффект.

Эффе́кторным органом, обеспечивающим процесс свертывания крови, в первую очередь является *печень*, где происходит синтез большинства свертывающих факторов и их ингибиторов.

За счет изменения проницаемости сосудистой стенки в кровь поступают тромбопластические вещества, стимулирующие активацию внешнего механизма свертывания крови, а также активатор плазминогена. Из тучных клеток, расположенных в соединительной ткани по ходу нервов и сосудов, выделяются поддерживающиеся в их монохроматических гранулах гепарин, гистамин и серотонин.

Определяющим моментом рефлекторно-гуморальной регуляции свертывания крови является *порог чувствительности рецепторов*. Раздражение рецепторов рефлексогенных зон кровеносных сосудов физиологически активными соединениями, непосредственно не участвующими в биохимической регуляции каскада свертывания (адреналин, серотонин, ацетилхолин и др.), вызывают наряду с другими вегетативными реакциями изменения системы свертывания крови.

Впервые в 1958 г. Б. А. Кудряшовым и сотрудниками были сформулированы представления о возбуждении противосвертывающей системы в ответ на раздражение хеморецепторов сосудов ферментом тромбином (см. тему VI). Позднее перфузией изолированных органов было показано, что не только тромбин, но и другие компоненты системы свертывания крови, такие, как претромбины I и II, трипсин, гепарин, фракция белков контактной стадии свертывания крови, антиплазмин активируют противосвертывающую систему, в то время как плазмин (фибринолитический фермент) оказывает действие, подобное адреналину и серотонину, вызывая активацию свертывающей системы. Противосвертывающая система контролируется преимущественно парасимпатической нервной системой, однако в отдельных ситуациях (например, при венозном стазе) участвует симпатический отдел вегетативной нервной системы.

В поддержании жидкого состояния крови и ее свертывания важная роль принадлежит системе гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. Во всех адаптивных реакциях организма, при стрессе, в поддержании постоянства внутренней среды эта система является важным звеном нейрогуморальной регуляции.

Усиленная секреция адреналина, АКТГ и глюкокортикоидов изменяют гормональный статус организма. Адреналин стимулирует повышенное свертывание крови, индуцируя агрегацию тромбоцитов и повышая уровень тромбопластических агентов. Однако он обеспечивает и выброс в кровь из сосудов и тканей активатора плазминогена. Кроме того, стимулированное адреналином появление тромбина в достаточной концентрации активирует противосвертывающую систему, что приводит к повышению в крови уровня гепарина, образующего комплексные соединения с белками крови и аминами. АКТГ обеспечивает поддержание высокого уровня гепарина, стимулируя его выброс из тканевых депо и уменьшение интенсивности выведения из кровотока.

Реактивность свертывающей и противосвертывающей систем крови зависит от исходного состояния организма и определяется не столько спецификой раздражителя, сколько общим нейрогуморальным ответом на него.

ТЕМА I. ОБЩИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЗАДАЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Фибриноген (метод Кона)

Необходимые реактивы: 4 М ацетатный буфер, pH 4,0, приготовленный из 4 М CH_3COONa , подкисленного концентрированной CH_3COOH . 53,3%-ный этанол (охлажденный до -20°C). Буфер А, pH 6,0, глицин-этанол-цитратный (75 г глицина, 65 мл 96%-ного этанола доводят до 1 л 0,05 М раствором 3-замещенного цитрата Na, pH которого предварительно доведен до 6,0 концентрирован-

ной HCl). Буфер Б, рН 7,2 готовится так же, как буфер А. 3,8%-ный раствор цитрата Na.

Ход работы. Бычью кровь, взятую с 3,8% цитратом Na в отношении 9:1, центрифигируют при 2000 об/мин в течение 60 мин. Плазму отделяют от форменных элементов крови сифонированием или с помощью пипетки Мора и охлаждают до 0°C (охлаждающая смесь: лед + соль). К такой плазме добавляют ацетатный буфер из расчета 0,5 мл буфера на 500 мл плазмы. Затем добавляют охлажденный до -20°C 53,3%-ный этанол до конечной концентрации 8%, для чего на каждый литр плазмы требуется 177 мл 53,3%-ного этанола. Добавление ведут по каплям на холоду (температура плазмы не должна превышать -3°C) при постоянном помешивании для предотвращения местного избытка этанола и защиты белка от денатурации. Помешивать следует осторожно, избегая образования пены. Выпавший осадок (фракция 1) после 1 ч стояния на холоду собирают центрифугированием при -3°C в течение 20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость оставляют для выделения плазминогена (см. тему V). Процедура дальнейшей очистки следующая: 100 г сырого вещества фракции 1 экстрагируют 500 мл буфера А. Вначале добавляют 30—50 мл охлажденного буферного раствора и тщательно перемешивают до получения гомогенной пасты, а затем постепенно добавляют остальное количество буфера. Суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10—15 мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок повторно точно так же обрабатывают буфером Б. Полученный после двух экстракций осадок фибриногена (фракция 2) хранят в холодильнике при -20°C.

При выполнении задач используют *коммерческие препараты* фибриногена и тромбина, выпускаемые Каунасским предприятием бакпрепаратов. Предварительно следует ознакомиться с их характеристиками, представленными на соответствующих вкладышах. Препарат фибриногена содержит значительную примесь солей.

Тканевой тромбопластин

Необходимые реактивы. Физиологический раствор; 0,025 М раствор CaCl_2 ; плазма крови крысы.

Ход работы. Используют серое вещество мозга крысы. Головной мозг тщательно очищают от кровеносных сосудов, промывают дистиллированной водой и подсушивают фильтровальной бумагой. Мозг взвешивают и растирают в ступке, добавляя на каждый грамм по 5 мл физиологического раствора. Вначале добавляют минимальное количество физиологического раствора и растирают мозг до получения однородной густой пасты. Суспензию переносят в центрифужную пробирку и, перемешивая стеклянной палочкой, нагревают на водяной бане при 58—59°C в течение 14 мин. Дают суспензии отстояться, осадок отбрасывают, а опалесцирующую жидкость употребляют в опыт. Твердые частицы можно удалить

центрифугированием при комнатной температуре в течение 5 мин при 1000 об/мин.

Определяют активность полученного неразбавленного тромбопластина и небольшой порции того же тромбопластина, разбавленного в 2 раза физиологическим раствором.

Определение активности. К 0,1 мл прогретой при 37°C крысиной плазмы добавляют 0,1 мл исследуемого раствора тромбопластина и инкубируют при 37°C в течение 10—15 с, затем добавляют 0,1 мл раствора CaCl_2 и определяют время свертывания. Оно должно составлять не более 18—20 с для активного тромбопластина. Если этому требованию соответствует разбавленная в 2 раза порция тромбопластинового концентрата, то весь имеющийся тромбопластин разбавляют физиологическим раствором в 2 раза, еще раз проверяют его активность, разливают по пробиркам и хранят их при -20°C .

Кефалин

Необходимые реактивы. Ацетон, эфир, физиологический раствор.

Ход работы. Головной мозг от 15 крыс промывают водой, переносят на фильтровальную бумагу и освобождают от пленки и кровеносных сосудов. *Обезвоживание мозга и все последующие операции проводят только под тягой!* Помещают мозг в ступку, заливают примерно равным объемом ацетона и тщательно растирают пестиком. Дают осесть твердым частицам, мутный раствор сливают и заливают свежую порцию ацетона. Обезвоживание повторяют несколько раз до тех пор, пока добавленный ацетон после перемешивания с тканью не будет оставаться прозрачным. При этом тканевой материал становится хлопьевидным и темнеет. Добавив последнюю порцию ацетона, осадок переносят в колбу на 500 мл и добавляют равный объем эфира. Колбу закрывают пробкой, перемешивают и оставляют стоять на ночь при комнатной температуре. Важно, чтобы все это время твердый материал оставался под эфиром. Фильтрованием через бумажный складчатый фильтр твердый материал удаляют и отбрасывают. Жидкость переносят в фарфоровую чашечку и оставляют под тягой до полного испарения эфира. *Следят, чтобы поблизости не было горелки!* Маслообразный осадок эмульгируют в физиологическом растворе до концентрации 3%, разливают в пробирки по 0,2 мл и хранят в холодильнике при температуре -20°C .

Урокиназа

Необходимые реактивы. 1 н. NaOH ; 1 н. HCl ; BaSO_4 (порошок для рентгеноскопии); 2%-ный раствор цитрата Na ; BaCl_2 ; этанол; 2%-ный раствор ЭДТА или трилона Б.

Ход работы. К 2—4 л мочи здоровых людей добавляют NaOH до pH 8,0. Через 3 ч отстаивания при $0-(+4)^\circ\text{C}$ надосадочную

жидкость декантируют и с помощью HCl доводят до pH 4,5. Образовавшуюся суспензию оставляют на ночь при $+4^\circ\text{C}$ в холодной комнате. Осадок отделяют центрифугированием при $+4^\circ\text{C}$ (при 8000 об/мин) и растворяют в объеме дистиллированной воды, составляющем 5% от первоначального объема мочи. Раствор подщелачивают до pH 8,5 и добавляют к нему BaSO_4 из расчета 1 г BaSO_4 на 1 л раствора. Смесь перемешивают в течение 15 мин при $+4^\circ\text{C}$. Адсорбент отделяют центрифугированием и промывают дистиллированной водой, взятой в количестве, равном 5% от первоначального объема мочи. Урокиназу элюируют раствором цитрата Na , количество которого составляет 3% от исходного объема мочи. Для полноты элюции обработку осадка BaSO_4 цитратом Na повторяют. Цитрат удаляют в виде малорастворимой бариевой соли. Для этого к раствору добавляют 3 моля сухого BaCl_2 на каждые 2 моля цитрата Na при $+5^\circ\text{C}$ и перемешивают 30 мин. Суспензию центрифугируют, осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость доводят до pH 4,5 с помощью HCl . Добавляют предварительно охлажденный при -20°C этанол до концентрации 20% и оставляют стоять на холоду 2 ч. Осадок отделяют центрифугированием (2000 об/мин, 30 мин) при -5°C , растворяют в дистиллированной воде в объеме, равном 2% от исходного объема мочи, pH доводят до 8,0. Ионы Ba^{2+} удаляют, добавляя 20 мл раствора ЭДТА или трилона Б на 1 л раствора при pH 8,0. Раствор диализуют против дистиллированной воды и снова осаждают урокиназу охлажденным до -20°C этанолом при pH 4,5 (0,01 н. HCl). Осадок собирают центрифугированием и растворяют в минимальном (1—2 мл) объеме дистиллированной воды. Об активности фермента судят по фибринолитической активности на стандартных пластинках фибрина.

ТЕХНИКА РАБОТЫ С КРЫСАМИ. ВЗЯТИЕ КРОВИ И ВНУТРИВЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Внутривенные инъекции и взятие проб крови для анализа требуют определенного навыка, для приобретения которого необходимо знать точное расположение яремных вен у крысы и уметь попадать в них иглой шприца.

Рекомендуется вначале у одной-двух крыс отпрепарировать вены и взять пробу крови. Для этого крысу привязывают за лапки к столику спиной вниз, крепко натягивая тесемки, чтобы животное не дергалось и не могло отвязаться во время опыта. Привязывание должно фиксировать крысу на доске так, чтобы ее передние лапы располагались не под прямым углом к туловищу, а были бы слегка прижаты к нему.

В области яремных вен у животного выщипывают шерсть. Иногда вены просвечивают сквозь кожу или же их пульсацию можно обнаружить, приложив палец к шее крысы. Крысу не наркотизируют!

Острыми ножницами делают продольный разрез в 1—2 см от ключицы в роstralном направлении. Разрезают кожу и лежащие

под ней мышцы. Выступившую кровь удаляют ватными тампонами, приготовленными заранее. В обнаженную яремную вену вводят иглу шприца и берут кровь.

Запомнив расположение вен относительно ключиц, берут кровь у крысы уже без предварительного рассечения кожи. Иглу удобно ориентировать под ключицу и вводить ее, направляя вперед и вверх. Научившись брать кровь и делать внутривенные инъекции, приступают к опыту. В опыте используют взрослых белых крыс (лучше самцов) массой тела 180—200 г.

Для взятия крови с целью получения плазмы иглу и шприц на 1 или 2 мл промывают консервантом (3,8%-ный раствор 3-замещенного цитрата Na), набирают его в шприц в объеме 0,1 мл и берут кровь из яремной вены до отметки 1 мл. Соотношение консерванта и крови должно быть 1:9. Консервант связывает ионы Ca^{2+} крови в недиссоциируемый цитрат Ca, блокируя процессы, направленные на активацию свертывания крови, благодаря чему она остается жидкой. Избыток консерванта (если по техническим причинам не удастся набрать нужное количество крови) нежелателен, так как это может изменять показатели свертывания крови. Кровь в шприце перемешивают с консервантом, осторожно по стенке переливают в пробирку Сали (диаметр 0,8—1,0 см, длина 12 см) и ставят в ледяную баню. Кровь центрифугируют при $+4^{\circ}\text{C}$ со скоростью 2000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования кровь разделяется на два примерно одинаковых слоя: верхний — плазма, нижний — эритроцитарная масса. Между ними располагается тонкий светлый слой тромбоцитов, или кровяных пластинок. Его отсутствие и появление неровной поверхности нижнего слоя свидетельствуют о том, что кровь частично свернулась. Плазму рекомендуется отсасывать микропипеткой на 0,2 мл с помощью груши и переносить в сухую пробирку.

Следует иметь в виду, что объем крови у животного составляет 1/13 часть его массы. Если необходимо получить значительный объем крысиной плазмы, то, отбирая порции крови, их не следует объединять. *Объединять можно только плазму.*

Со свежей плазмой можно работать один день при условии ее хранения при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Если предстоит работать с плазмой на протяжении более длительного времени, ее разливают небольшими порциями в пробирки и хранят при температуре -20°C .

Для приготовления сыворотки крови кровь крыс, взятую без консерванта, выливают из шприца в пробирку и оставляют на 2 ч в термостате при температуре 37°C . За это время от свертывающейся крови отделяется сыворотка, в которой происходит инактивация тромбина. Сыворотку хранят при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ или -20°C .

Для получения эуглобулиновой фракции плазмы последнюю разводят примерно в 20 раз, чем снижают действие ингибиторов и доводят pH до 5,2. Помимо плазмина и активаторов плазминогена, в этой фракции осаждаются также фибриноген, протромбин и другие белки.

Необходимые реактивы. 1%-ный раствор CH_3COOH ; боратно-солевой раствор (0,25%-ный раствор буры в физиологическом растворе).

Ход работы. К 0,25 мл плазмы добавляют 4 мл дистиллированной воды, подкисляют до pH 5,2, добавляя 0,075 мл 1%-ного раствора CH_3COOH . Смесь осторожно перемешивают. Наблюдается выпадение эуглобулиновой фракции. После 20-минутного стояния при комнатной температуре пробы центрифугируют 7 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, а пробирки высушивают опрокидыванием на фильтровальную бумагу. Оставшуюся на стенках и краях пробирок жидкость удаляют фильтровальной бумагой. Осадок эуглобулинов растворяют в 0,25 мл боратно-солевого раствора и сразу используют для определения фибринолитической активности.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ И ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМ КРОВИ

Общее время свертывания крови

Необходимые реактивы. Физиологический раствор.

Ход работы. Из яремной вены крысы чистым стеклянным шприцем, промытым физиологическим раствором, отбирают 0,2 мл крови. Как только кровь в шприце дойдет до отметки 0,2, включают секундомер. Кровь из шприца выливают в сухую пробирку Сали и инкубируют при 37°C на водяной термостатированной бане. Через каждые 30 с пробирку наклоняют на $60-70^\circ$ для выявления момента свертывания: кровь при наклоне пробирки перестанет перемещаться. Обычно время образования плотного сгустка составляет у крысы 2—4 мин. Иногда общее время свертывания оказывается укороченным за счет попадания в иглу тканевого сока. В таком случае необходимо повторить определение, предварительно хорошо промыв шприц физиологическим раствором. Общее время свертывания крови рассчитывают как среднее значение из нескольких определений (не менее трех).

Время рекальцификации плазмы

Этот тест служит для характеристики прокоагулянтной активности плазмы, богатой тромбоцитами. Добавление к такой плазме Са в виде раствора CaCl_2 создает условия для осуществления процесса свертывания плазмы активацией внутреннего механизма (начальный этап — контакт крови и плазмы со стеклянной поверхностью шприца и пробирки).

Необходимые реактивы. 0,025 М раствор CaCl_2 ¹.

¹ Необходимо использовать химически чистый CaCl_2 в неповрежденной заводской упаковке. Применяют точно 0,025 М раствора CaCl_2 : вначале готовят 0,1 М раствор CaCl_2 в дистиллированной воде, определяют его концентрацию титрованием раствором ЭДТА или трилона Б и корректируют концентрацию исходного раствора дальнейшим разведением. Для определения концентрации

Ход работы. В пробирки Сали разливают цитратную плазму по 0,1 мл из микропипетки и прогревают при 37°C в течение 2—3 мин. Включают секундомер и точно на определенной секунде (например, на 10-й или 15-й с) добавляют 0,1 мл CaCl_2 , выдувая его из микропипетки. Отмечают время образования хорошо сформированного сгустка, осторожно вынимая пробирку из водяной бани и слегка наклоняя ее. При образовании сгустка плазма не должна растекаться по стенке пробирки. Для достоверности полученных результатов определение повторяют не менее трех раз.

Протромбиновое время плазмы

Необходимые реактивы. Тканевой тромбопластин; 0,025 М раствор CaCl_2 .

Ход работы. В пробирке Сали смешивают 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл тромбопластина, прогревают на водяной бане при 37°C в течение 1—2 мин. Включают секундомер и точно на определенной секунде из микропипетки выдувают 0,1 мл CaCl_2 . Отмечают время образования плотного сгустка. Для достоверности полученных результатов определение повторяют не менее трех раз.

Частичное тромбопластиновое время плазмы

Это — весьма чувствительный тест для выявления аномалий свертывания, обусловленных недостаточностью прокоагулянтов в крови или повышенным уровнем ингибиторов. Время свертывания плазмы больных гемофилией при добавлении к ней вместе с CaCl_2 высокоактивного мозгового тромбопластина (*полный тромбопластин*) полностью нормализуется, т. е. аномалия внутреннего механизма свертывания компенсируется иницированием внешнего механизма. Разведенный тромбопластин (*частичный тромбопластин*) уже не способен нормализовать время свертывания гемофилической плазмы. Многие материалы обладают активностью частичного тромбопластина: суспензия тромбоцитов, растительные фосфолипиды, кефалины животных.

Обычно в тесте частичного тромбопластинового времени используют кефалин, полученный из мозгового тромбопластина.

Необходимые реактивы. 0,3%-ная эмульсия кефалина в физиологическом растворе; 0,025 М раствор CaCl_2 .

Ход работы. 0,1 мл плазмы прогревают 30 с на водяной бане при температуре 37°C и добавляют 0,1 мл 0,3%-ной эмульсии кефалина. Инкубируют 5 мин при 37°C и добавляют 0,1 мл CaCl_2

раствора CaCl_2 в коническую колбу на 100 мл наливают 40 мл дистиллированной воды, 5 мл 1 н. NaOH , точно 5 мл приготовленного раствора CaCl_2 и добавляют на кончике шпателя порошок, представляющий смесь 0,1 г индикатора мурексида (аммонийная соль пурпуровой кислоты), растертого с 10 г NaCl . Титруют CaCl_2 0,1 н. раствором ЭДТА (3721,6 мг в 100 мл воды) до перехода окраски из красной в фиолетовую. Титрование начинают немедленно после добавления щелочи во избежание выпадения осадка CaCO_3 , определение повторяют не менее 3 раз. Рассчитывают концентрацию CaCl_2 в исходном растворе (1 моль ЭДТА связывает 1 моль Ca^{2+}) и путем разведения корректируют ее до 0,025 М.

Рабочий раствор CaCl_2 хранят в сосуде с плотно притертой пробкой (лучше на холоду).

точно на 10-й или 15-й с включенного секундомера. Отмечают время образования плотного сгустка. Для получения достоверных результатов определение повторяют не менее трех раз.

Антитромбиновая активность

Метод основан на способности тромбина образовывать сгусток с плазмой или раствором фибриногена. Время образования сгустка может удлиняться под влиянием ингибиторов тромбина или ингибиторов полимеризации фибрин-мономеров (см. темы IV и V), присутствующих в плазме опытных животных или добавленных в анализируемую систему.

Необходимые реактивы. Раствор тромбина в физиологическом растворе (концентрация 4—6 мг/мл); плазма крови крыс или 0,3%-ный раствор (по белку) фибриногена в физиологическом растворе.

Ход работы. Эндогенные антитромбины. К 0,2 мл плазмы крови нормальных (контрольных) крыс добавляют 0,2 мл раствора тромбина. Время образования сгустка должно составлять 30—40 с. Определение проводят следующим образом: 0,2 мл плазмы помещают в пробирку Сали и прогревают при 37°C на водяной бане. Спустя 1—2 мин включают секундомер и точно на 10-й и 15-й с выдувают из микропипетки 0,2 мл тромбина. Периодически вынимают пробирку и, наклоняя, наблюдают образование сгустка. В момент образования плотного сгустка останавливают секундомер. Проводят не менее трех параллельных определений. Если время свертывания оказалось больше или меньше необходимого, меняют концентрацию тромбина. Далее определяют тромбиновое время свертывания для плазмы крови опытных животных. Увеличение его по сравнению с нормой свидетельствует об антитромбиновой активности, укорочение — о коагулянтной.

Экзогенные антитромбины. К 0,2 мл раствора фибриногена добавляют 0,2 мл физиологического раствора и 0,2 мл тромбина такой концентрации, чтобы время свертывания составляло 30—40 с. Заменяя физиологический раствор анализируемым препаратом, определяют время свертывания. Удлинение его свидетельствует об антитромбиновой активности. Ее выражают в секундах по сравнению с контролем. Вместо фибриногена можно использовать плазму крови нормальных крыс.

Уровень фибриногена плазмы

Уровень фибриногена в плазме крови определяют по количеству фибрина, образующегося при добавлении к плазме тромбина. Присутствие веществ, обладающих антикоагуляционной активностью, может замедлить процесс образования фибрина или препятствовать полному превращению фибриногена в фибрин, что будет выражаться в заниженных результатах. Очень важно в этом методе использовать достаточное количество тромбина и анализировать не менее двух параллельных порций плазмы.

С помощью этого теста нельзя определить фибриноген, если он находится в плазме в виде комплексного соединения с гепарином, а значит, не способен свертываться тромбином.

Метод Бидвелл. Необходимые реактивы. Физиологический раствор; медианаловый буфер (2,9 г мединала и 1,9 г CH_3COONa растворяют в 100 мл дистиллированной воды; к 5 мл этого раствора добавляют 90 мл 0,85%-ного раствора NaCl и доводят рН до 7,4 HCl на потенциометре; 0,85%-ным раствором NaCl доводят объем до 100 мл); раствор тромбина (5 мг/мл физиологического раствора); 0,1 н. NaOH ; 0,1 н. HCl ; 12,5%-ный раствор Na_2CO_3 ; 0,01 М раствор CuSO_4 ; реактив Фолина¹.

Ход работы. Плазму крови в объеме 0,2 мл разливают в центрифужные пробирки, добавляют по 4,8 мл медианалового буфера и помещают на 5 мин в термостат при 37°C. Добавляют по 0,1 мл раствора тромбина, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, которую оставляют в пробирке, и инкубируют 60 мин при температуре 37°C. Сгусток фибрина наматывают на стеклянную палочку, отжимают, вынимают из пробирки, промывают физиологическим раствором, высушивают на фильтровальной бумаге и помещают в пробирку с 2 мл NaOH . Нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения сгустка, нейтрализуют HCl до рН примерно 7,0 (по бумажному универсальному индикатору), доводят объем до 5 мл дистиллированной водой и измеряют поглощение на СФ при длине волны 280 нм против слепой пробы, состоящей из смеси щелочи и кислоты.

Можно определять белок фотометрически. Для этого к щелочному раствору фибрина добавляют 6 мл раствора Na_2CO_3 и 1,0 мл раствора CuSO_4 , перемешивают и через 10 мин добавляют 1 мл реактива Фолина, разбавленного в три раза дистиллированной водой. Через 30 мин определяют экстинкцию на ФЭК'е с красным светофильтром. Слепая проба должна содержать 2 мл щелочи, 6 мл Na_2CO_3 , 1 мл CuSO_4 и реактив Фолина. Сравнивая экстинкции, полученные при анализе опытных и контрольных проб плазмы, судят об изменении уровня фибриногена в плазме крови опытных животных.

Метод Белицера. Необходимые реактивы. 0,06 М фосфатный буфер, рН 7,0; 0,04 М раствор моноиодуксусной кислоты²; раствор тромбина: 4 мг/мл физиологического раствора; 1,5%-ный раствор CH_3COOH .

¹ *Приготовление реактива Фолина.* В круглодонную колбу на 1 л наливают 350 мл дистиллированной воды. Добавляют 50 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 12,5 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и перемешивают до полного растворения. К полученному раствору приливают 25 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты, 50 мл концентрированной HCl и кипятят смесь с обратным холодильником в течение 10 ч. Добавляют 75 г LiSO_4 , 25 мл дистиллированной воды и 3 капли брома. Кипятят без холодильника в течение 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до 500 мл. Перемешивают и фильтруют. Хранят в плотно закрытых темных флаконах. Реактив (желтого цвета) не должен иметь зеленоватого оттенка, обусловленного присутствием продуктов восстановления вольфрама. Для окисления необходимо добавить 2—3 капли брома и прокипятить.

² Работать с моноиодуксусной кислотой с большой осторожностью, только под тягой и в резиновых перчатках, чтобы не получить ожога!

Ход работы. Плазму крови в объеме 0,2 мл разливают в центрифужные пробирки, добавляют по 1,6 мл фосфатного буфера и помещают в термостат при 37°C на 5 мин. Вносят 0,1 мл моноiodуксусной кислоты, спустя 3 мин добавляют 0,1 мл тромбина, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, которую оставляют в пробирке, и инкубируют при 37°C 15—30 мин. При этом формируется нестабилизированный фибрин, поскольку фактор XIIIa (фактор XIII сопутствует фибриногену) оказывается заингибированным моноiodуксусной кислотой. Сгусток фибрина наматывают на стеклянную палочку, отжимают, вынимают из пробирки, промывают физиологическим раствором, высушивают на фильтровальной бумаге и растворяют при комнатной температуре в 5 мл CH_3COOH .

Определяют поглощение на СФ при 280 нм против раствора CH_3COOH . Сравнивая экстинкции, полученные для опытных и контрольных проб плазмы крови, судят об изменении уровня фибриногена в крови опытных животных. Этим методом можно определить содержание фибриногена в миллиграмм-процентах. Для этого необходимо определить экстинкцию раствора еще при 320 нм. Расчет производят по формуле $(E_{280} - E_{320}) \cdot 25\,000 / 14,84$, где E_{280} и E_{320} — значения экстинкции для соответствующих длин волн, 25 000 — коэффициент для выражения количества фибриногена в миллиграмм-процентах; 14,84 — коэффициент экстинкции ($E_{1\text{ см}}^1\%$) для фибриногена при 280 нм в кислой среде.

Фибринолитическая активность по методу Аструпа

Метод основан на способности фермента плазмина растворять стабилизированный фибрин. В крови животных и человека в норме практически отсутствует свободный плазмин, а уровень активаторов плазминогена меняется в зависимости от ряда экзогенных и эндогенных факторов. При взятии крови у животных в результате стресса на привязывание, иммобилизацию и боль повышается уровень активатора плазминогена, который и определяет фоновую фибринолитическую активность плазмы. Активность определяют на фибриновых пластинках, используя коммерческие препараты фибриногена и тромбина.

В составе фибрина находится примесь плазминогена, поэтому при взаимодействии исследуемой плазмы с пластиной фибрина происходит также активация плазминогена фибриновой пластины активаторами, содержащимися в плазме или эуглобулиновой фракции. Так генерируется дополнительное количество плазмина. Чтобы разграничить активность плазмина и активность активаторов плазминогена, одновременно анализируют две параллельные пробы на стандартных фибриновых пластинках и фибриновых пластинках, лишенных примеси плазминогена. Плазминоген разрушают прогреванием при 86°C в течение 30 мин.

Приготовление пластин стабилизированного фибрина. Необходимые реактивы. 0,3%-ный (по белку) раствор фибриногена в физиологическом растворе; раствор тромбина (2—4 мг/мл физиологического раствора); активность раствора тромбина должна быть такой, чтобы при добавлении 0,2 мл раствора к 0,2 мл свежей крысиной плазмы образовался сгусток за 8—10 с. Фибриновые пластины готовят в чашках Петри. Чашки Петри должны иметь

ровное дно и находиться на совершенно горизонтальной поверхности, чтобы фибриновые пленки имели одинаковую толщину. Поверхность пластины делят на равные секторы (6 или 8), очерчивая стеклянное дно чашки карандашом по стеклу, и нумеруя их. Целесообразно это сделать на пустых чашках.

Ход работы. В конической колбочке объемом 25 мл или стаканчике смешивают 9 мл раствора фибриногена и 0,2 мл раствора тромбина. Смесь быстро выливают в чашку Петри диаметром 9,5 см, избегая образования пены. Чашки прикрывают крышками, но не закрывают полностью и оставляют на 60—90 мин при комнатной температуре. Полученные пластины называются *стандартными*. Часть пластин прогревают в течение 30 мин при 86°C для денатурации плазминогена (между чашкой и крышкой прокладывают фильтровальную бумагу, для поглощения воды, конденсирующейся при прогревании пластины). На стандартных пластинах фибрина можно определить суммарную активность активаторов плазминогена и собственную фибринолитическую активность плазмина. *Прогретые* пластины используют для определения фибринолитической активности плазмина. Пластины фибрина хранят при температуре +4°C.

Определение активности. На пластинах стабилизированного фибрина определяют собственную фибринолитическую активность и активность активаторов плазминогена плазмы крови, эуглобулиновой фракции плазмы и различных препаратов (плазмин, тканевой активатор плазминогена, урокиназа, белки контактной стадии свертывания крови).

На стандартные и прогретые фибриновые пластины наносят не менее двух параллельных проб анализируемого препарата в объеме 0,05 мл и не менее двух параллельных проб в объеме 0,1 мл. Пробы наносят микропипеткой в центр заранее размеченного сектора на равном расстоянии от центра и от краев чашки. Чашки закрывают крышками (между крышкой и чашкой прокладывают фильтровальную бумагу для поглощения конденсирующейся воды) и ставят в термостат при 37°C на 16—24 ч. Активность оценивают величиной зоны лизиса фибрина, которая вычисляется как произведение двух взаимно перпендикулярных диаметров (мм²). Для определения активности активатора плазминогена вычисляют зоны лизиса на стандартных пластинах (зоны лизиса обусловлены активностью плазмина и активностью активатора плазминогена) и вычитают зоны лизиса, полученные на прогретых пластинах (зоны обусловлены активностью плазмина).

За единицу фибринолитической активности принимают такое количество фермента, 1 мл которого дает зону лизиса в 10 мм² (с учетом разведения). Удельную фибринолитическую активность выражают в единицах/мг белка. Фибринолитическую активность плазмы выражают в квадратных миллиметрах в расчете на 1 мл плазмы, активность эуглобулиновой фракции — в квадратных миллиметрах, отнесенных к 1 мг белка или к 1 мл исходной плазмы, из которой выделена эта фракция.

Неферментативная фибринолитическая активность

Эта активность характеризует уровень в плазме комплексных соединений гепарина с белками плазмы крови и биогенными аминами. В основе метода лежит способность комплексов гепарина вызывать деполимеризацию нестабилизированного фибрина. Для блокады активности фактора XIIIa (его предшественник содержится в препаратах фибриногена) вносят моноиодуксусную кислоту или моноиодацетамид. Для ингибирования активации плазминогена активаторами, содержащимися в плазме, в пластины фибрина вносят ϵ -аминокапроновую кислоту (ЕАКК). В более высокой концентрации ЕАКК используют для блокады активности плазмина, который может присутствовать в плазме крови опытных животных. Такую же роль выполняет ингибитор трипсина из соевых бобов.

Приготовление пластин нестабилизированного фибрина. Необходимые реактивы. Раствор I: 0,3%-ный (по белку) раствор фибриногена в смеси, содержащей равные объемы 3,8%-ного раствора 3-замещенного цитрата Na и 0,1 М трис-HCl буфера, pH 7,35.

Раствор II: 24 мг свежелерекристаллизованной из воды моноиодуксусной кислоты и 172,3 мг ЕАКК, растворенные в 8 мл 0,1 М трис-HCl буфера, pH 7,35 (профильтровать, если есть осадок). Раствор тромбина (4 мг/мл физиологического раствора); 2%-ный раствор монохлоруксусной кислоты; 6%-ный раствор ЕАКК.

Ход работы. Фибриновые пластины готовят, смешивая 5 мл раствора I и 2 мл раствора II, и инкубируют 10—15 мин при температуре 37°C. В стаканчик на 50 мл наливают 5 мл смеси растворов I и II, добавляют из микропипетки 0,1 мл раствора тромбина, слегка перемешивают и выливают в чашку Петри. Свертывание фибриногена обычно продолжается несколько минут. Спустя 2 ч пластины могут быть использованы для анализа. На пластину наносят каплю 2%-ного раствора монохлоруксусной кислоты, растворение фибрина в месте нанесения кислоты свидетельствует о том, что фибрин нестабилизированный.

Определение активности. Наносят анализируемые пробы так, как это описано в предыдущем методе, и ставят в термостат при 37°C. Спустя 2 ч вынимают чашки и измеряют зоны лизиса. Затем чашки снова закрывают крышками и ставят дальше на инкубацию при 37°C. Спустя 12—16 ч после нанесения проб на пластину дополнительно замеряют зоны лизиса.

При анализе проб плазмы для блокады активности присутствующего плазмина инкубируют 10 мин при 37°C плазму (0,1 мл) с равным объемом 6%-ной ЕАКК в физиологическом растворе.

Агрегация тромбоцитов

Принцип фотометрического метода определения агрегации тромбоцитов основан на регистрации изменения оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы до и после внесения в нее АДФ (в концентрации 0,01 мг/мл), адреналина (сухого, в концентрации 3—5 мкг/мл) или тромбина (в концентрации 0,1 ед/мл). Эти агенты вызывают агрегацию тромбоцитов при постоянном перемешивании плазмы. Исследование обычно проводят в специальных агрегометрах, но может быть использован и обычный ФЭК.

Необходимые реактивы. Тромбин (1—2 мг/мл физиологического раствора); физиологический раствор.

Ход работы. Используют цитратную кровь в объеме 8 мл, взятую в полиэтиленовые пробирки с несмачиваемой поверхностью, и сразу помещают в ледяную баню. Плазму, богатую тромбоцитами, получают отстаиванием крови в течение 2—4 ч при $+4^{\circ}\text{C}$ или центрифугированием ее на холоду при 1000—1500 об/мин в течение 7 мин. 2,5 мл плазмы отбирают в полиэтиленовую пробирку. На ФЭК'е при светофильтре № 7 в кюветах с поперечным сечением 1 мм определяют оптическую плотность испытуемой плазмы. В качестве контроля используют физиологический раствор.

В пробирку с плазмой добавляют 0,1 мл раствора тромбина с активностью 0,3 единицы (приготовлен из тромбина активностью 3 ед/мл) и опускают металлический стержень от магнитной мешалки, покрытый полиэтиленовой оболочкой. Пробирку помещают в водяную баню при 37°C и перемешивают плазму с тромбином при оптимальной скорости на магнитной мешалке в течение 8 мин. После этого тотчас определяют оптическую плотность плазмы. В результате агрегации тромбоцитов оптическая плотность плазмы снижается. Чем больше понижение оптической плотности плазмы, тем выше степень агрегации тромбоцитов. Выражают степень агрегации тромбоцитов индексом или в процентах, например исходная оптическая плотность — 0,40. После добавления тромбина — 0,25. Индекс агрегации $0,40/0,25 = 1,6$, или 60%. В норме индекс агрегации составляет 1,00—1,25.

При определении кинетики агрегации тромбоцитов пробы для определения оптической плотности при перемешивании плазмы отбирают с частыми интервалами и плазму перемешивают более продолжительное время (15—20 мин).

Тромбоэластография

Тромбоэластография — метод, позволяющий графически регистрировать процесс свертывания с помощью прибора тромбоэластографа. При регистрации каждому виду патологии соответствуют характерные кривые — тромбоэластограммы.

Принцип действия тромбоэластографа основан на измерении вязкости крови, изменяющейся в процессе свертывания.

Кровь в объеме 0,36—0,5 мл помещают в кювету датчика, куда опускается цилиндр, подвешенный на тонкой стальной проволоке. Кювета совершает вращательные маятникообразные движения. При свертывании вязкость крови постепенно увеличивается, при этом усиливается сцепление между диском и кюветой и увеличивается амплитуда поворота цилиндра. Движение диска записывается на бумажной ленте регистрирующим механизмом.

Тромбоэластография устанавливает: время реакции R , которое отражает образование тромбина и ф. Ха; время свертывания —

время образования сгустка — K от начала выпадения первых нитей фибрина до формирования сгустка; величину максимального расхождения линий ma , характеризующую прочность или эластичность сгустка E . R определяют расстоянием от начала прямой линии до ее расширением, равного 1 мм. K полученному числу прибавляют время наполнения кюветы n . K — момент от конца времени реакции R до расхождения краев тромбоэластограммы на 20 мм; ma — максимальная амплитуда — расстояние между краями тромбоэластограммы (рис. 188).

E рассчитывают по формуле $E = 100 \cdot ma / (100 - ma)$. В норме ma равна 50—56 мм, величина R — от 9 до 14 мин, K — от 5 до 8 мин, E — от 80 до 180.

Тромбоэластограмма позволяет диагностировать повышенную и пониженную свертываемость крови (рис. 188). При ускоренной свертываемости R и K укорачиваются, ma возрастает. При замедлении, наоборот, R и K удлиняются, ma уменьшается. Укорочение показателей R и K на тромбоэластограммах свидетельствуют об ускорении первой и второй фаз свертывания крови. Повышение ma свидетельствуют главным образом об увеличении концентрации фибриногена. Величина E характеризует также функциональную активность тромбоцитов и количество и качество фибриногена. Для анализа рекальцификации плазмы крови в кювету вносят 0,26 мл цитратной плазмы и добавляют 0,1 мл 1,29%-ного раствора $CaCl_2$.

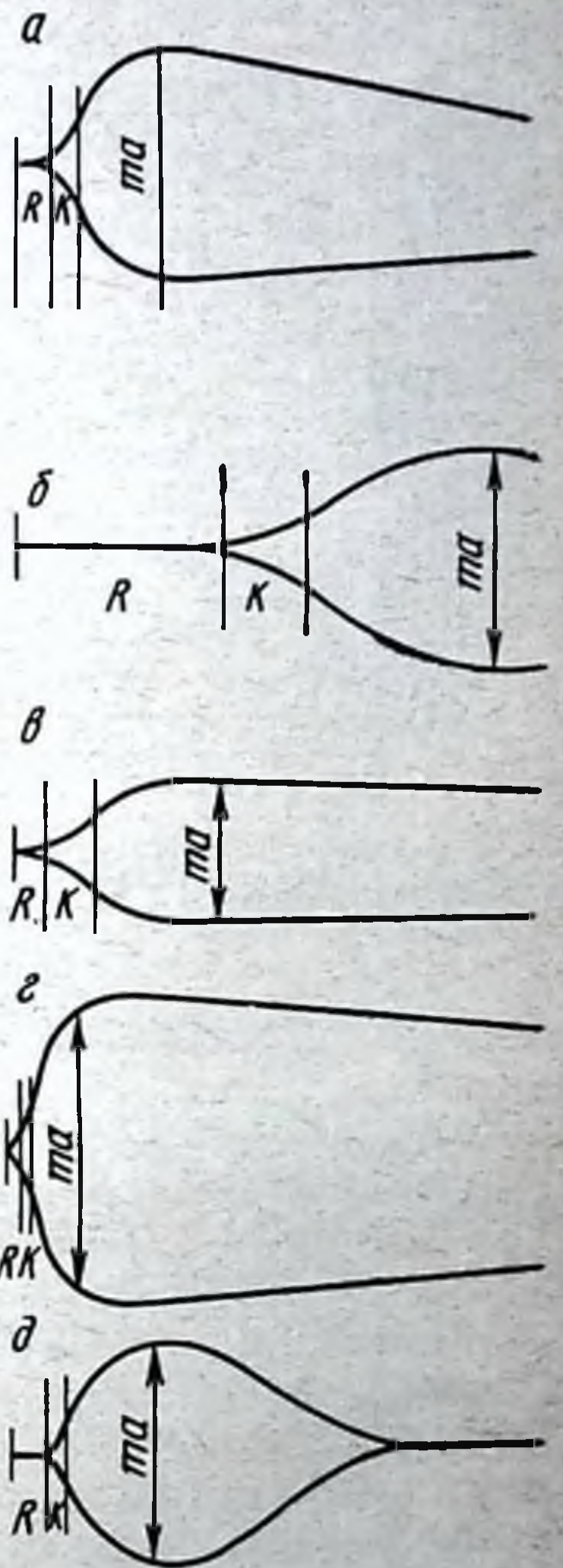


Рис. 188. Тромбоэластограммы при различных состояниях организма:

a — норма, $б$ — гемофилия, $в$ — тромбоцитопения, $г$ — тромбоз, $д$ — фибринолиз; объяснение см. в тексте

Коагулография

Принцип метода коагулографии основан на измерении электрического сопротивления крови, помещенной в ячейку с двумя электродами. В процессе свертывания изменяется сопротивление крови, что отражается на движущейся ленте коагулографа. Пользуясь коагулографом, можно измерять не только процесс свертывания крови, но также рекальцификацию плазмы (рис. 189): 0,15 мл цитратной плазмы крови помещают в ячейку, дают плаз-

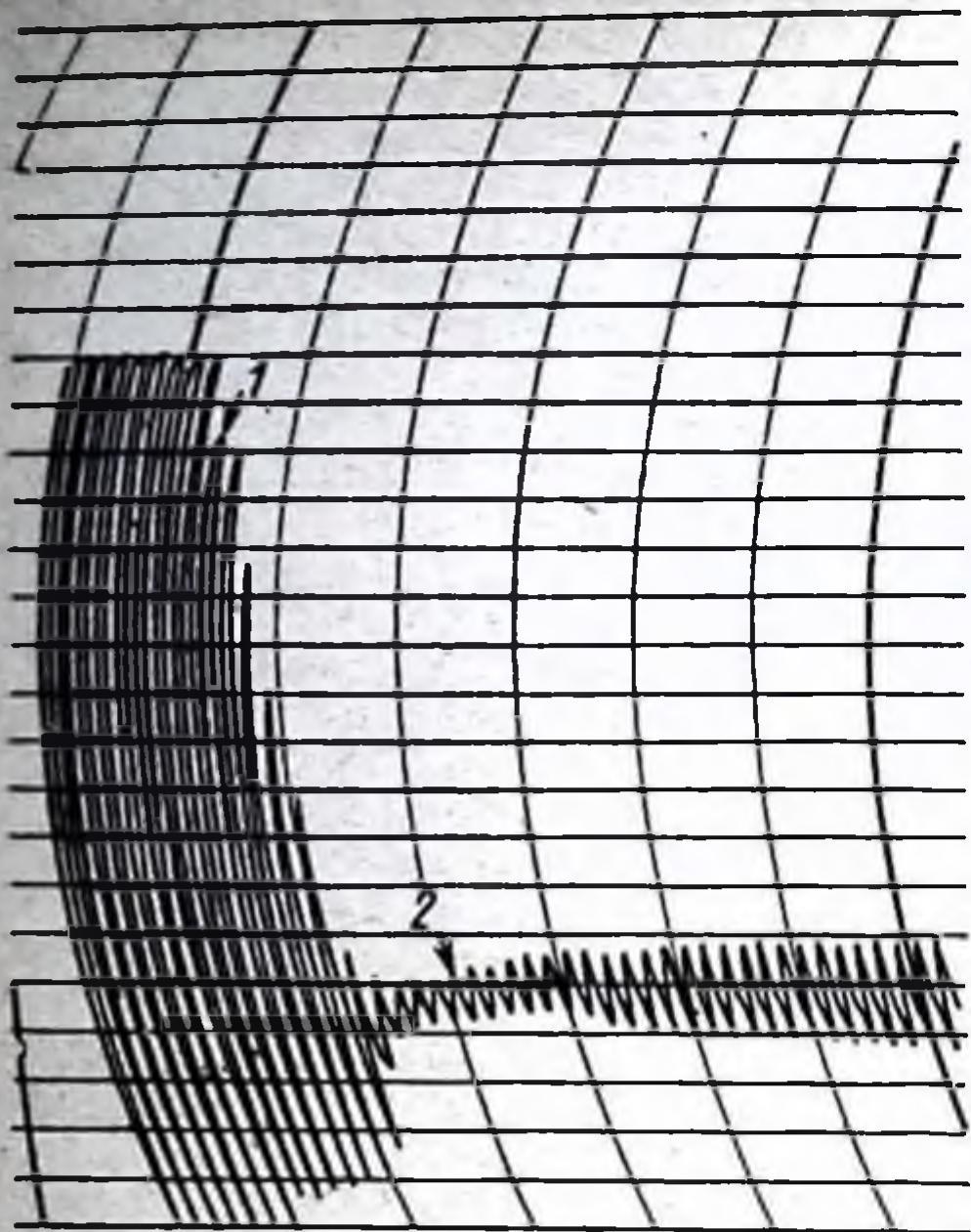


Рис. 189. Пример записи процесса рекальцификации плазмы крови на коагулографе (объяснение см. в тексте)

ме прогреться и через 1 мин добавляют 0,05 мл 1,29%-ного раствора CaCl_2 и сразу включают секундомер. Время от начала исследования до первого колебания с уменьшенной амплитудой (точка 1) определяет начало свертывания T_1 . Время от начала исследования до первого колебания с минимальной амплитудой (точка 2) — конец свертывания T_2 . Продолжительность свертывания — время от первого колебания с уменьшенной амплитудой до первого колебания с минимальной амплитудой T ; $T = T_2 - T_1$. Время, составляющее 1 мин, соответствует шести колебаниям ячейки. T_1 соответствует показателю R тромбоэластограммы, T — показателю K тромбоэластограммы.

Определение казеинолитической активности

Метод основан на определении тирозина, отщепившегося от казеина под действием ферментов.

Необходимые реактивы. Казеин; 1/15 М фосфатный буфер, pH 7,4; 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 5%-ный раствор NaOH ; 20%-ный раствор Na_2CO_3 ; 0,1%-ный раствор тирозина в 0,2 н. HCl .

Ход работы. Приготовление субстрата. 10 г сухого казеина растворяют в 200 мл горячего (90°) фосфатного буфера, раствор профильтровывают через слой ваты, нерастворившийся осадок отбрасывают.

Построение стандартной кривой по тирозину. Готовят точно 0,1%-ный раствор тирозина в 0,2 н. HCl (в мерной пробирке на 10 мл). Калибровочную кривую по тирозину строят так, чтобы в 2,0 мл пробы содержалось от 10 до 100 мкг тирозина. К раствору тирозина добавляют 1 мл NaOH , 5 мл дистиллированной воды, 3 мл раствора Na_2CO_3 и 1 мл неразведенного реактива Фолина. Спустя 30 мин колориметруют на ФЭК'е с красным светофильтром № 3, 660 мкм (или на микроФЭК'е с красным светофильтром № 8).

Определение казеинолитической активности. К 1 мл исследуемого раствора фермента добавляют 1 мл фосфатного буфера и 4 мл 5%-ного раствора казеина. Содержание тирозина определяют в смеси до инкубации фермента с субстратом (0-е время) и после инкубации при 37°C в течение 60 мин. Для этого отбирают из смеси пробы по 2 мл и определяют в них тирозин после осаждения

белков 5 мл трихлоруксусной кислоты. Спустя 20 мин осадок удаляют фильтрованием через бумажный фильтр, а к 2 мл фильтрата добавляют 1 мл NaOH, 5 мл H₂O, 3 мл Na₂CO₃ и 1 мл реактива Фолина. Через 30 мин интенсивность развившейся окраски измеряют на ФЭК'е.

Разницу в поглощении раствора до инкубации (0-е время) и после инкубации (60 мин) выражают в микрограммах кислоторастворимого тирозина в соответствии с калибровочной кривой. За единицу казеинолитической активности принимают такое количество фермента, которое повышает содержание кислоторастворимого тирозина на 450 мкг в среде 3,3%-ного казеина за 1 ч инкубации при 37°C. Для получения достоверных данных делают не менее трех параллельных определений казеинолитической активности фермента. При расчете казеинолитической активности учитывают общий фактор разведения, который равен 21 (последовательные разведения в 6 и 3,5 раза). Удельную казеинолитическую активность КЕ рассчитывают на 1 мг фермента.

Определение концентрации белка по методу Лоури

Предлагаемый модифицированный метод Лоури сочетает в себе биуретовую реакцию на пептидные связи и реакцию Фолина на тирозин и триптофан.

Необходимые реактивы. 1. 2%-ный раствор Na₂CO₃, приготовленный на 0,1 М NaOH. 2. 0,5%-ный раствор CuSO₄, приготовленный на 1%-ном растворе 3-замещенного цитрата Na. 3. Смесь 1 мл раствора (1) и 50 мл раствора (2) непосредственно перед определением. 4. Реактив Фолина. 5. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 0,25 мг/мл.

Ход работы. Исследуемый раствор, содержащий 10—100 мкг белка, доводят дистиллированной водой до 0,4 мл. Смешивают с 2 мл реактива 3 и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Добавляют 0,2 мл реактива Фолина, перемешивают и через 30—40 мин измеряют поглощения на ФЭК'е при длине волны 750 мкм, светофильтр № 8, красный. Предварительно строят калибровочную кривую, используя раствор сывороточного альбумина. Следует иметь в виду, что в присутствии 0,1 М фосфатного буфера наблюдается образование осадка.

ТЕМА II. КОНТАКТНАЯ СТАДИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Контактная стадия, инициирующая внутренний механизм свертывания крови, обусловлена следующими белками плазмы крови: ф. XII, ф. XI, прекалликреином и высокомолекулярным кининогеном (ВМК) (см. рис. 184; табл.). Недостаточность одного из этих факторов вызывает удлинение общего времени свертывания крови и времени рекальцификации плазмы без признаков кровоточивости.

При врожденной недостаточности плазменных ф. XII (болезнь Хагемана) или XI активация внутреннего механизма свертывания крови определяется ф. XI тромбоцитов, который хотя и отличается от плазменного ф. XI по своей структуре (тетрамер, состоящий из субъединиц с мол. массой 52 000, соединенных S—S-связями), но по антигенным свойствам полностью идентичен ему.

Ф. XII, XI и прекалликреин — предшественники сериновых ферментов — превращаются в свои активные формы (см. табл.) при контакте с отрицательно

заряженной поверхностью коллагена, эластина, фосфолипидов активированных тромбоцитов, а также при контакте со стеклом, коалином, сульфатированными полисахаридами и т. д. ВМК ускоряет активацию этих факторов, образуя комплексы с ф. XI и прекалликреином, адсорбция которых происходит через посредство этого регуляторного белка, поскольку в структуре ВМК имеется участок полипептидной цепи, обладающий высоким сродством к отрицательно заряженным поверхностям. Способность адсорбироваться на отрицательно заряженных поверхностях у ф. XII обусловлена структурой N-концевой части его молекулы. При адсорбции происходит частичная спонтанная активация ф. XII в ф. XIIa за счет конформационной перестройки. Достаточно незначительных количеств ф. XIIa, чтобы стимулировать активацию прекалликреина в калликреин. Последняя вызывает ограниченный протеолиз одноцепочной структуры ф. XII, превращая его в ф. α XIIa или в ф. β XIIa, лишенный N-концевого фрагмента (см. рис. 187; табл.). Только ф. α XIIa, остающийся адсорбированным на отрицательно заряженной поверхности, способен активировать ф. XI в ф. XIa и далее усиливать активацию прекалликреина в калликреин (см. рис. 184). Ф. β XIIa, попадая в циркуляцию, также способен превращать прекалликреин в калликреин. Калликреин не только активирует адсорбированный на поверхности ф. XII, но и активирует кининогены плазмы (высокомолекулярный, мол. масса 120 000 и низкомолекулярный, мол. масса 60 000), отщепляя низкомолекулярные вазоактивные пептиды-кинины: брадикинин, лизил-брадикинин и метионил-лизил-брадикинин. Протеолизированная форма ВМК сохраняет способность активировать контактную стадию свертывания крови.

Физиологические свойства кининов многообразны. Они усиливают местный кровоток, расширяют сосуды, повышают их проницаемость, вызывают боль. Их действие выражается в физиологических эффектах сокращения гладкомышечных волокон матки и кишечника, спазма бронхов, расширения сосудов с последующим снижением артериального давления, учащения дыхания, развития отека, угнетения диуреза. Наряду с гистамином и серотонином кинины являются мощными медиаторами воспалительных процессов, которые всегда имеют место в области повреждения сосудов.

Ф. XIIa принимает непосредственное участие в активации фибринолиза. Активированный им калликреин непосредственно превращает плазминоген в плазмин. Слабо выраженная активаторная способность в отношении плазминогена обнаружена у ф. β XIIa и XIa. В свою очередь, плазмин наряду с калликреином плазмы способен активировать ф. XII в ф. β XIIa. Таким образом, функции ф. XIIa, калликреина и плазмينا тесно связаны и взаимообусловлены. Поэтому компоненты калликреин-кининовой системы и фибринолитической системы одновременно являются и компонентами свертывания крови.

Цель работы. Выделить из плазмы крови быка компоненты контактной стадии свертывания крови на основе их высокого сродства к отрицательно заряженной поверхности стеклянного порошка; определить прокоагулянтную, казеинолитическую и фибринолитическую активности.

Задача. Выделение фракции белков контактной стадии свертывания крови и определение их активности¹

Методика. Необходимые реактивы. 3,8%-ный раствор 3-замещенного цитрата Na; $Al_2(SO_4)_3$; алюмоаммонийные квасцы; 10%-ный раствор NaOH; мозговой тромбопластин (см. тему I); 0,025 М $CaCl_2$; стеклянный порошок (размер частиц стекла 1—2 мм); 2 н. NaOH; 2 н. HCl; физиологический раствор; этанол;

¹ При работе используют только полиэтиленовую посуду, избегая контакта плазмы со стеклянной поверхностью.

глицин-солевой буфер, рН 9,6 (50 г NaCl в 1 л раствора, содержащего 0,1 М глициновый буфер, рН 9,6).

Получение геля гидроокиси алюминия. 22 г $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ растворяют в 600 мл воды при 63°C. 76,7 г алюмоаммонийных квасцов растворяют в 150 мл воды при 58°C. К раствору $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ при сильном перемешивании и температуре 63°C добавляют 100 мл 10%-ного аммиака и раствор квасцов, предварительно профильтрованный через вату. Реакцию проводят при температуре 60°C. Сразу после образования геля отделяют его от раствора центрифугированием без охлаждения при 1000 об/мин в течение 15 мин. Промывают осадок геля два раза, добавляя в центрифужные стаканы с осадком равные объемы дистиллированной воды и хорошо перемешивая палочкой. Воду удаляют центрифугированием при 1000 об/мин в течение 15 мин. Белый осадок хранят в стеклянной посуде при 4°C.

Подготовка стеклянного порошка и заполнение колонки. Стеклянный порошок в объеме около 2 л помещают в эмалированное ведро, заливают 2 н. NaOH так, чтобы стекло было полностью погружено в щелочь, перемешивают и оставляют на 1 ч. Щелочь сливают и промывают стекло проточной водопроводной водой до нейтрального значения рН. Аналогичным образом промывают стекло 2 н. HCl. После того как стекло тщательно отмыто от кислоты водопроводной водой, промывают его несколько раз 0,85%-ным раствором NaCl и заполняют им колонку. В чистую колонку размером 3×90 (см) наливают небольшой объем дистиллированной воды и освобождают от пузырьков воздуха пространство под основанием колонки. Заполняют колонку примерно на 1/3 физиологическим раствором и вносят порциями стеклянный порошок. При работе с колонкой следят, чтобы стекло всегда было покрыто водой.

Ход работы. 1. Кровь, взятую с цитратом Na в отношении 9:1, отцентрифугировать при +4°C в течение 40 мин со скоростью 2000 об/мин и отделить плазму. 10 мл плазмы разлить в полиэтиленовые пробирки по 2 мл и заморозить при -20°C.

2. *Удаление белков протромбинового комплекса.* Освободить плазму от белков протромбинового комплекса обработкой плазмы свежеприготовленным гелем гидроокиси алюминия. Проинкубировать плазму 40 мин при 37°C с 1/10 объема геля $\text{Al}(\text{OH})_3$. Отцентрифугировать пробу инкубата (1—2 мл) в течение 5 мин при 1000 об/мин и определить в надосадочной жидкости протромбиновое время (см. тему I).

Если протромбиновое время меньше 15 мин, то процедуру адсорбции на геле повторить один раз или несколько, добавляя свежую порцию геля. После полного удаления белков протромбинового комплекса (протромбиновое время больше 15 мин) осадок отделить центрифугированием (15 мин при 2000 об/мин) и отбросить.

4. *Адсорбция на стекло и активация «контактных» белков.* Пропустить беспротромбиновую плазму через колонку со стеклян-

ным порошком со скоростью вытекания капля за 5 с. Пропущенную через колонку плазму можно использовать для выделения фибриногена. Промыть колонку 5 л физиологического раствора той же скоростью. Элюировать контактные белки с колонки глицин-солевым буфером, рН 9,6. Собрать фракции по 6 мл в пластиковые пробирки и определить в каждой пробе поглощение при 280 нм на СФ против буфера.

5. *Концентрирование контактных белков.* Объединить фракции, содержащие максимальное количество белка ($E_{280} > 0,2$), довести рН до 5,8 с помощью 1 н. HCl (по потенциометру) и охладить до 0°C. По каплям при механическом перемешивании добавить предварительно охлажденный при -20°C 96%-ный этанол до 40%-ного насыщения. Всю процедуру проводить при охлаждении. Охлаждающая смесь — 2 части соли и 1 часть размельченного льда. Через 2 ч осадок собрать центрифугированием в течение 45 мин при 6000 об/мин при температуре -5°C и растворить в минимальном объеме физиологического раствора. Осадок, растворенный в физиологическом растворе, представляет смесь следующих белков: ф. α XIIa, ф. β XIIa, калликреин, комплекс ВМК-ф. XIa, возможна также примесь неактивных проферментов и ВМК.

6. *Определение прокоагулянтной активности.* Бычью плазму (предварительно замороженную) инкубировать при комнатной температуре с отмытым и сухим стеклянным порошком (300 мг/мл плазмы). После 10 мин инкубации плазму отцентрифугировать 3 мин при 1000 об/мин и определить время свертывания при 37°C в системе: 0,1 мл нормальной плазмы, 0,1 мл активированной плазмы и 0,1 мл 0,03 М CaCl₂. Отметить по секундомеру время от добавления раствора CaCl₂ до образования сгустка (сделать не менее трех определений).

Инкубация плазмы со стеклом способствует превращению присутствующих в ней неактивных контактных белков в активные ферменты, время свертывания плазмы при рекальцификации укорачивается по сравнению с контролем. Контролем служит время свертывания смеси, состоящей из 0,2 мл нормальной плазмы и 0,1 мл 0,03 М CaCl₂. Принять время свертывания неразведенной активированной плазмы за 100 ед. активности «контактных» белков. Определить время свертывания активированной плазмы, разведенной физиологическим раствором в 2, 4, 8, 16 раз, что соответствует 50, 25, 12,5 и 6,25 ед. активности. Построить кривую зависимости времени свертывания от активности, выраженной в относительных единицах. Активность выделенных «контактных» белков измерить следующим образом: к 0,1 мл нормальной плазмы добавить 0,1 мл раствора контактных белков и 0,1 мл 0,03 М CaCl₂. По стандартной кривой определить активность «контактных» белков. Если полученные значения времени свертывания не укладываются в стандартную кривую, сделать разведения «контактных» белков и снова определять активность.

Приготовить стандартные и прогретые фибриновые пластины и определить на них фибринолитическую активность. Определить

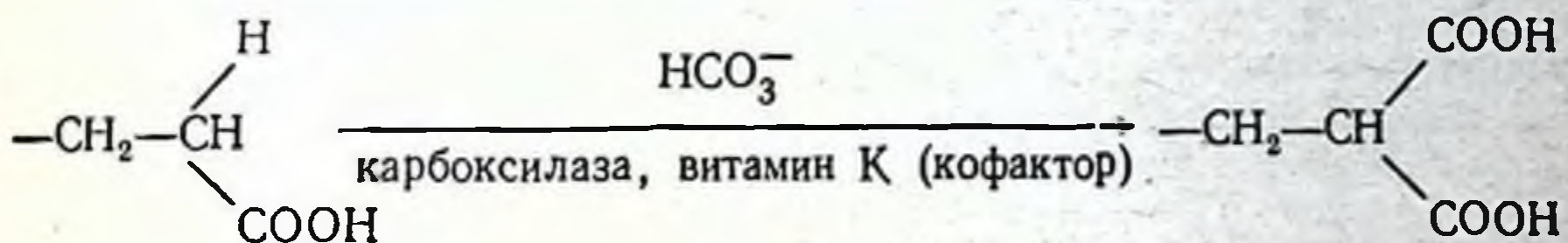
казеинолитическую активность и концентрацию белка в исходной плазме и в препарате «контактных белков» (см. тему I).

Обработка результатов. Представляют для раствора контактных белков и исходной плазмы: объем (мл); концентрацию белка (мг/мл); удельную прокоагулянтную активность (ед/мг белка); степень очистки; удельную активность активатора плазминогена (мм²/мг белка); удельную казеинолитическую активность (кЕ/мг белка). Чертят кривую элюции белков со стеклянной колонки.

ТЕМА III. ПРОТРОМБИН И ЕГО АКТИВАЦИЯ В ТРОМБИН

Превращение протромбина в тромбин представляет одну из основных реакций процесса свертывания крови. Она происходит под действием ф. Ха в присутствии регуляторного белка ф. V и ионов Ca²⁺ на отрицательно заряженных поверхностях мембран активированных тромбоцитов, разрушенных эндотелиальных клеток или на тканевых фосфолипидах. Активирующий комплекс называют *протромбиназой* (см. рис. 184).

Протромбин и ф. X относятся к белкам *протромбинового комплекса*, их основные характеристики представлены в таблице и на рис. 187. Остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты (Гла), локализованные в N-концевых областях молекул этих белков, образуются на уровне пострибосомальной модификации при биосинтезе в клетках печени из соответствующих предшественников при непосредственном участии витамина К. Карбоксилирование специфических остатков глутаминовой кислоты осуществляется зависимой от витамина К карбоксилазой:



Аналогичным путем происходит карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в N-концевых областях других белков протромбинового комплекса: в ф. IX, VII, XIV и в белке S. При недостаточности витамина К нарушается биосинтез полноценных молекул протромбина и других белков протромбинового комплекса. Аномальный протромбин, у которого вместо остатков Гла присутствуют остатки Глу, теряет способность активироваться в тромбин специфическим активатором — ф. Ха, что может приводить к кровоточивости при таких заболеваниях, как ранняя детская геморрагия, обтурационная желтуха и некоторые болезни печени. В клинике широко используют антагонисты витамина К, производные 4-оксикумарина, чтобы снизить высокий уровень белков протромбинового комплекса у больных и тем самым уменьшить опасность тромбообразования.

Из рис. 190 видно, что серин активного центра протромбина расположен в С-концевой части молекулы, а нетромбиновая часть представлена двумя весьма подобными доменами, по форме напоминающими крендели. Один из них расположен в протромбиновом фрагменте 1, другой — в протромбиновом фрагменте 2.

Фиксация протромбина и ф. Ха на поверхности фосфолипидов осуществляется за счет остатков Гла этих белков через посредство ионов Ca²⁺. Так происходит концентрирование субстрата вблизи специфического фермента. Высокая скорость активации протромбина фактором Ха обеспечивается фактором V, причем в активированной, частично протеолизированной тромбином или ф. Ха форме (табл.). Ф. V обычно локализуется на мембранах активированных тромбоцитов и является специфическим, высокоаффинным участком связывания ф. Ха. Протромбин также связывается с ф. V через домен-«крендель», расположенный в протромбиновом фрагменте 2. Это связывание обеспечивает такое изменение конформации молекулы протромбина, которое оказывается наиболее благоприятным для взаимодействия с ф. Ха. Активация протромбина заключается в расщеплении двух пептидных связей, чувствительных к ф. Ха (рис. 190). В результате гидролиза 1-й связи возникает протромбин 2 (мол. масса 35 000—42 000)

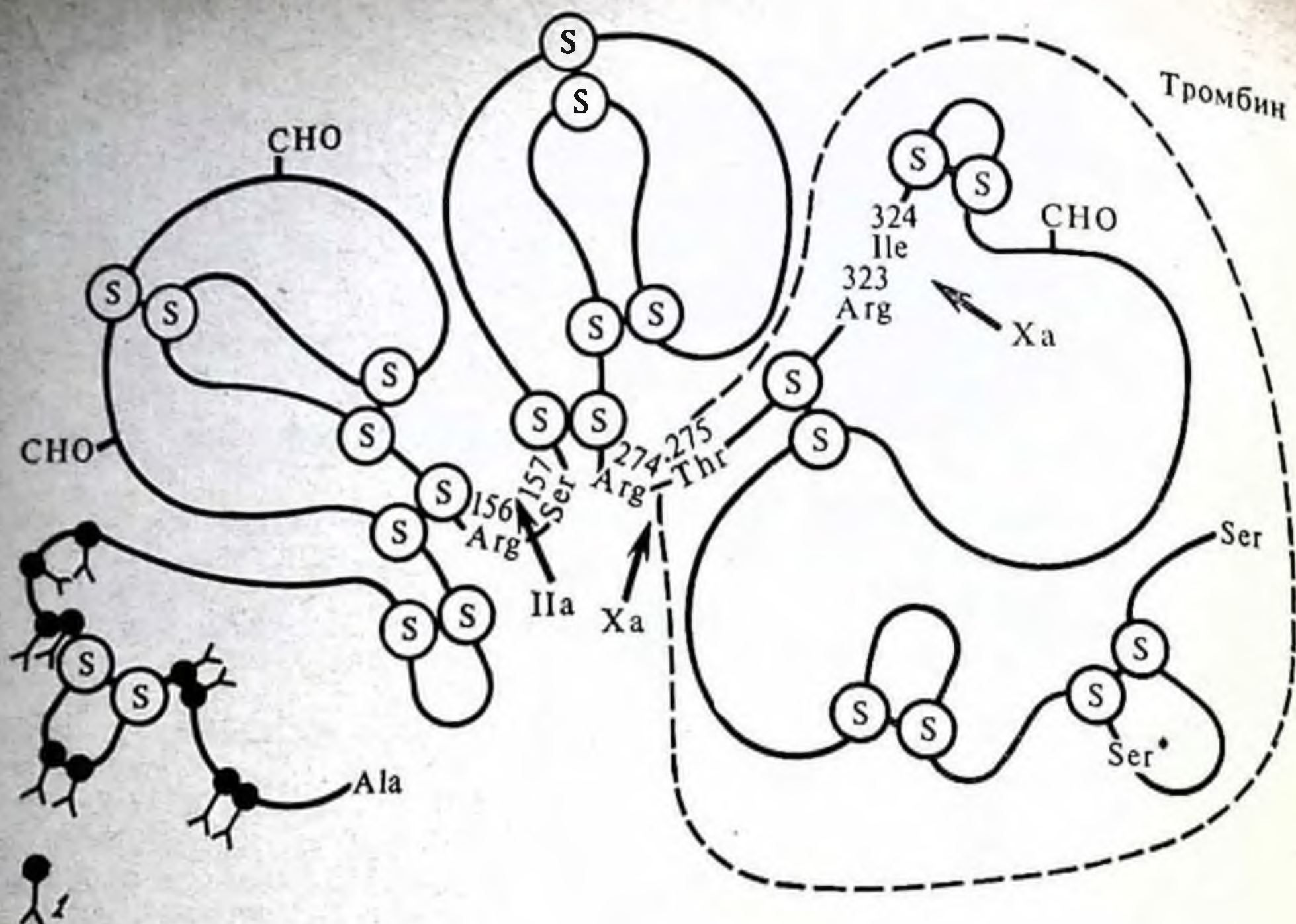


Рис. 190. Расположение дисульфидных связей $S=S$, остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (1) и чувствительных к фактору Ха и тромбину связей в молекуле протромбина (по S. Magnusson, 1975):

Ser* — серин активного центра тромбина, CHO — углеводный остаток

и профрагмент (мол. масса 31 000—37 000). При гидролизе 2-й связи — двухцепочечная структура тромбина (мол. масса 36 000—40 000). Образовавшийся тромбин может расщепить в протромбине одну пептидную связь (рис. 190). При этом образуются протромбиновый фрагмент 1 (мол. масса 18 000—28 000) и претромбин 1 (мол. масса 49 000—61 000). Возникающий при этой реакции претромбин 1, лишенный остатков Гл, не способный связаться с каталитической поверхностью фосфолипидов, практически не может активироваться в тромбин фактором Ха. Протромбиновый фрагмент 1 или профрагмент, носители остатков Гл, конкурируют с протромбином за связывание с поверхностью фосфолипидов и тем самым ограничивают скорость активации протромбина в тромбин.

Протеолиз протромбина тромбином осуществляется только при патологических состояниях организма, когда на фоне повышенного уровня тромбина, возникающего при одновременном активировании внешнего и внутреннего механизмов свертывания крови, происходит нарушение регуляторных механизмов, ограничивающих его генерацию и обеспечивающих ингибирование фермента.

Протромбин может превращаться в активный фермент под действием трипсина и специфических протеаз различных змеиных ядов. В этих случаях активация протромбина происходит иным путем.

Тромбин, основные характеристики которого отражены в таблице, представляет уникальную биорегуляторную сериновую протеазу. Воздействуя на белки плазмы крови, он способен отщеплять фибринопептиды А и В от молекулы фибриногена (рис. 187), избирательно гидролизует только четыре или шесть пептидных связей, образованных остатками аргинина, из более чем ста, доступных действию трипсина. Тромбин способен активировать ф. XIII в ф. XIIIa, вызывая ограниченный протеолиз одной пептидной связи, также образованной остатком аргинина, в α субъединицах профермента. Тромбин регулирует образование ф. Ха и активацию протромбина тем, что, воздействуя на регуляторные белки — ф. V и VIII, вызывает их ограниченный протеолиз, чем повышает кофакторные

функции этих белков. Однако он может снижать активность ф. V и VIII путем более глубокого протеолиза. С большим эффектом тромбин осуществляет эту последнюю функцию через посредство ф. XIV, который он активирует также путем ограниченного протеолиза только одной аргининовой пептидной связи в тяжелой цепи этого белка (см. табл., рис. 184).

Способность активировать ф. XIV проявляется у тромбина, иммобилизованного на поверхности эндотелиальных клеток через посредство белка тромбомодулина, в 20 000 раз сильнее, чем у свободного фермента. Следует отметить, что в таком иммобилизованном состоянии тромбин не способен превращать фибриноген в фибрин. У тромбина в отличие от других сериновых ферментов ярко выражен участок связывания с высокомолекулярными субстратами. Благодаря этому он связывается не только с фибриногеном, но даже более предпочтительно с белками-рецепторами на поверхности тромбоцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов. Поэтому тромбин — эффективный индуктор агрегации тромбоцитов. В экспериментах на культурах клеток показано, что тромбин обладает митогенной активностью, стимулируя пролиферацию клеток и фибробластов. Соединяясь со специфическими белками-рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, тромбин стимулирует секрецию этими клетками простациклина, мощного ингибитора агрегации тромбоцитов (см. рис. 185).

Тромбин ингибируется антитромбином III и антитромбином VM в присутствии гепарина, а также α_2 -макроглобулином (см. табл.), поглощается ретикуло-эндотелиальной системой. Высокоспецифическим ингибитором тромбина является гирудин (мол. масса ок. 10 000), содержащийся в секрете слюнных желез медицинских пиявок.

Цель работы. Выделить протромбин из бычьей плазмы, определить его активность и проактивировать в тромбин.

Задача. Выделение протромбина и его активация в тромбин

Методы выделения протромбина основаны на его способности сорбироваться на солях щелочно-земельных металлов, что обусловлено наличием в нем остатков Гла. При этом вместе с протромбином адсорбируются и другие белки протромбинового комплекса: ф. X, IX, VII, XIV и белок S. Фракционирование протромбина $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и изоэлектрическое осаждение не освобождают его от примесей белков протромбинового комплекса. Получить чистый протромбин возможно только, используя ионообменную хроматографию.

Для адсорбции протромбина используют осадок цитрата бария, который образуется при взаимодействии хлористого бария с цитратом натрия, содержащимся в исходной плазме. Предлагаемым методом получается протромбин, содержащий примеси белков протромбинового комплекса. Это позволяет стимулировать аутоактивацию протромбина в присутствии 25%-ного раствора 3-замещенного цитрата Na и получить фермент тромбин. Под действием цитрата Na ф. VII претерпевает конформационные изменения, подобные тем, которые вызывает в нем тканевый фактор (см. рис. 184; табл.) и превращается в ф. VIIa. Последний активирует ф. X, который, в свою очередь, превращает протромбин в тромбин. Этот процесс активации происходит медленно в отличие от физиологической активации протромбина протромбиназой.

Необходимые реактивы. 2,8%-ный раствор цитрата Na; 1 M BaCl_2 ; физиологический раствор; 0,2 M раствор ЭДТА или трилона Б, pH 7,4 (74,45 г ЭДТА или 69,2 г трилона Б помещают в мерную колбу на 1 л и доливают около 900 мл дистиллированной воды — препарат очень плохо растворяется в воде, поэтому колбу оставляют на ночь при 37°C; после полного растворения осадка доводят на потенциометре pH раствора до 7,4 10 н. NaOH, а затем водой до метки в мерной колбе), насыщенный при +4°C раствор

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 н. HCl ; 0,05 М трис- HCl буфер, рН 7,2—7,4; мозговой тромбопластин (см. тему I); 0,025 CaCl_2 ; BaSO_4 (для рентгеноскопии). Бычья или крысиная плазма, полученная из крови, взятой с консервантом 2,4%-ным раствором оксалата Na в отношении 9:1.

Ход работы. 1. *Выделение протромбина.* Использовать кровь, взятую с цитратом Na , соотношение 8:1. Центрифугировать кровь 50 мин при 2000 об/мин с охлаждением. Отделить плазму сифонированием или с помощью пипетки Мора.

Добавить к 2 л охлажденной до 0°C плазмы по каплям из капельной воронки при перемешивании с помощью мешалки 160 мл раствора BaCl_2 . Проводить эту процедуру в холодной комнате, контролируя, чтобы температура реакционной смеси не превышала $+5^\circ\text{C}$. Оставить смесь перемешиваться еще в течение 60 мин и затем центрифугировать 30 мин при 2000 об/мин с охлаждением. Надосадочную жидкость отбросить, а осадок с адсорбированными на нем белками протромбинового комплекса промыть физиологическим раствором. Для этого суспендировать его в 300 мл охлажденного физиологического раствора и сразу же центрифугировать. Надосадочную жидкость отбросить, а осадок можно оставить на ночь в холодной комнате.

К осадку цитрата Ba добавить 300 мл раствора ЭДТА или трилона Б и оставить перемешиваться под мешалкой в холодной комнате на 2—4 ч. Иногда, если не достигнуто полное растворение, целесообразно смесь оставить в холодной комнате на ночь.

Для фракционирования протромбина использовать $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Добавить к раствору равный объем насыщенного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, рН 7,0, при перемешивании (температура $+4^\circ\text{C}$). При 50%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ осаждаются сопутствующие протромбину примеси. Мешать суспензию еще 40 мин, а затем центрифугировать на холоду при 2000 об/мин в течение 50 мин. Осадить из надосадочной жидкости протромбин при 66%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Предварительно довести рН раствора до 7,0 и при перемешивании с охлаждением добавлять маленькими порциями сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 13,5 г соли на 100 мл раствора. Продолжать перемешивание в течение 1 ч, собрать осадок протромбина продолжительным центрифугированием (2 ч при 2000 об/мин). Растворить его в минимальном объеме воды, тщательно смывая со стенок центрифужного стакана, и поставить на диализ против дистиллированной воды в холодной комнате. Многократно менять воду. Продолжать диализ до тех пор, пока полностью не удалятся ионы SO_4^{2-} , что установить по реакции с насыщенным раствором BaCl_2 (BaSO_4 выпадает в осадок). Подкислить диализат до рН 5,4 (по потенциометру) с помощью 0,1 н. HCl и оставить на 1 ч при 0°C . Удалить выпавшие в осадок белковые примеси центрифугированием, а прозрачный раствор протромбина довести до рН 4,6 с помощью 0,1 н. HCl (изоэлектрическая точка протромбина). Оставить на 1 ч при 0°C . Центрифугировать на холоду 30 мин при 2000 об/мин, осадок растворить в минимальном объеме 0,05 М

трис-буфера, рН 7,2—7,4 (2—4 мл). Хранить раствор протромбина при температуре -20°C .

2. *Определение активности протромбина.* Получить субстратную плазму — источник фибриногена и других свертывающих факторов. Использовать оксалатную бычью плазму, лишенную протромбина: обработать 5—10 мл плазмы BaSO_4 , перемешивая палочкой при комнатной температуре в течение 15 мин (из расчета 60 мг BaSO_4 на 1 мл плазмы). Отделить осадок центрифугированием и отбросить, плазму повторно обработать тем же количеством BaSO_4 при тех же условиях. Отцентрифугировать.

Построить калибровочную кривую. Разлить в пробирки субстратную плазму по 0,1 мл и оставить прогреваться в водяной бане при 37°C . Добавить к прогретой субстратной плазме 0,1 мл оксалатной плазмы (источник протромбина) и 0,1 мл активного тромбопластина. Включить секундомер, точно на 10-й или 15-й с прилить в пробирку 0,1 мл CaCl_2 . Отметить, по секундомеру время, необходимое для образования четко выраженного сгустка (содержимое пробирки не должно литься или тянуться). Подобное определение повторить не менее трех раз, получая близкие значения для времени свертывания. Условно принимают, что это время свертывания соответствует 100 единицам протромбина.

Сделать разведения исходной плазмы в 1, 4, 8, 16 и 32 раза физиологическим раствором и определить время образования сгустка, соответствующее 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 единицам протромбина. Каждое определение повторить не менее трех раз.

Построить график зависимости единиц протромбина (ось абсцисс) от времени свертывания в секундах (ось ординат) на двойной логарифмической бумаге. При этом получается прямая линия. Продолжить прямую до пересечения с осью абсцисс. По этой прямой можно определить в препаратах содержание протромбина, превышающее 100 единиц (необходимо учитывать снижение ингибиторов при разведении).

Определить единицы протромбина в препарате. Определить время свертывания, заменяя оксалатную плазму исследуемым раствором протромбина. Если время свертывания оказывается меньше 10 с, сделать разведения так, чтобы время свертывания соответствовало средним значениям калибровочной кривой.

3. *Активация протромбина.* Исследовать способность протромбина активироваться в тромбин в 25%-ном растворе цитрата Na . Для этого в растворе протромбина в трис-буфере, рН 7,2, определить концентрацию белка и тромбиновую активность и добавить сухой 3-замещенный цитрат Na до конечной концентрации 25%. Проводить активацию при комнатной температуре в течение 24 ч. Отбирать пробы через 6 и 16 ч. Обессоливать пробы диализом против физиологического раствора на холоду. Для ускорения проводить диализ под мешалкой. При отрицательной реакции с насыщенным раствором BaCl_2 (на присутствие ионов цитрата) определить концентрацию белка по методу Лоури и тромбиновую активность.

4. **Определение тромбиновой активности.** Определить активность тромбина (в секундах) по времени образования сгустка при добавлении к 0,2 мл 0,3%-ного раствора фибриногена равного объема исследуемого раствора при 37°C.

Предварительно прогреть порции фибриногена в пробирках Сали при 37°C и точно по секундомеру на 10-й или 15-й с из микропипетки на 0,2 мл выдуть исследуемый раствор.

В момент образования плотного сгустка остановить секундомер. Провести не менее трех определений.

Обработка результатов. Представляют схему выделения протромбина и удельную активность полученного препарата. Строят график, отражающий нарастание свертывающей активности тромбина в процессе аутокаталитической активации протромбина в 25%-ном растворе цитрата Na.

ТЕМА IV. ПРЕВРАЩЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА В ФИБРИН. СТАБИЛИЗАЦИЯ ФИБРИНОВОГО СГУСТКА ФАКТОРОМ XIIIa

Фибриноген, основной белок плазмы крови (табл.), представляет собой димер трех полипептидных цепей $A\alpha$, $B\beta$ и γ , попарно соединенных дисульфидными связями. Примерно половина этих связей участвует в образовании *дисульфидного узла*, объединяющего N-концевые области всех шести полипептидных цепей молекулы фибриногена и определяющего третичную структуру центрального E-домена. Остальные дисульфидные связи реализуются в соединении трех различных цепей фибриногена по типу *дисульфидных колец* (рис. 191). Благодаря четырем дисульфидным кольцам, по два в каждой из половинок, молекула фибриногена оказывается разделенной на три домена: один центральный и два идентичных крайних (D-домены), α -спирализованные полипептидные участки из 111 аминокислотных остатков (рис. 191, 4), наподобие стержней соединяют крайние домены с центральным.

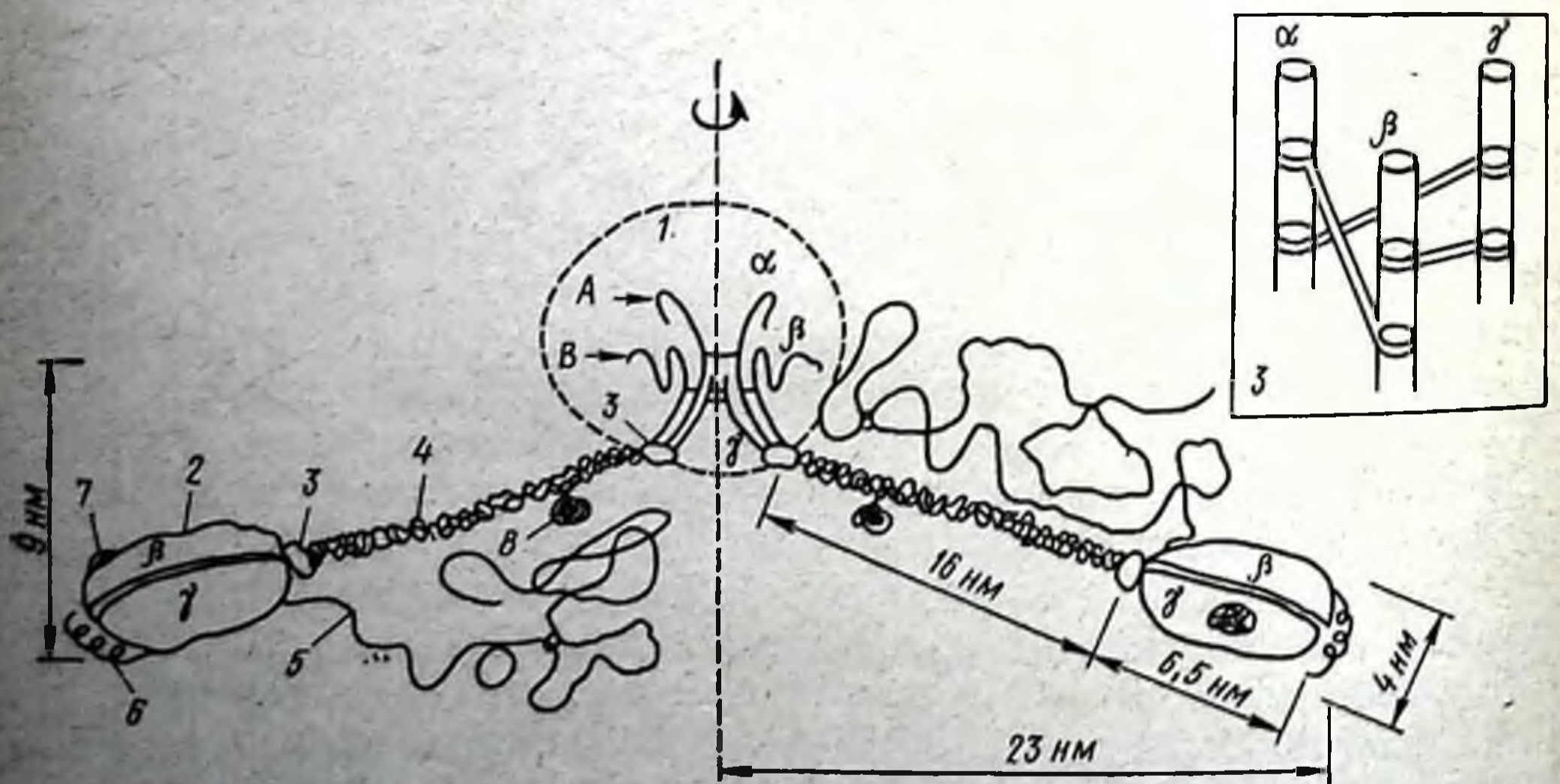


Рис. 191. Молекула фибриногена (по R. F. Doolittle, 1977):

A, B — N-концевые фибринопептиды, отторгаемые тромбином от α - и β -цепей; 1 — центральный E-домен, 2 — концевой D-домен, 3 — симметричные дисульфидные кольца, связывающие α , β и γ -цепи в молекуле фибриногена, 4 — участок, соединяющий домены, 5, 6 — C-концевые области α - и γ -цепей, 7, 8 — углеводные компоненты β - и γ -цепей

Функционально активные N-концевые области A α - и B β -цепей фибриногена расположены в центральном домене, а функционально активные C-концевые области A α - и γ -цепей относятся к крайним доменам.

Превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина — заключительный этап каскада реакций белков плазмы крови (см. рис. 184) осуществляется в три стадии.

1. Ферментативная стадия заключается в ограниченном протеолизе фибриногена тромбином: в расщеплении четырех аргинил-глициновых пептидных связей. В результате этого гидролиза от N-концевых областей A α - и B β -цепей отторгаются два фибринопептида A и два фибринопептида B, причем в первую очередь отторгается фибринопептид A со скоростью, в 40 раз превышающей скорость отщепления фибринопептида B. Фибринопептид A содержит 16, а фибринопептид B — 14 аминокислотных остатков, причем оба они имеют относительно высокое содержание аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, что обуславливает избыток отрицательного заряда на центральном домене фибриногена. Удаление фибринопептида A снижает, а удаление фибринопептида B полностью снимает этот заряд, что стимулирует спонтанную полимеризацию возникающих фибрин-мономеров. Фибринопептиды A и B участвуют в регуляции микроциркуляции, усиливая действие брадикинина на сокращение гладкой мускулатуры; фибринопептид B обладает ярко выраженным вазоконстрикторным действием.

2. Полимеризация фибрин-мономеров начинается сразу после удаления двух фибринопептидов A за счет возникшего высокого сродства двух участков центрального домена одной молекулы к комплементарным участкам, расположенным по одному в C-концевых областях γ -цепей крайних доменов двух различных молекул фибрин-мономеров (рис. 192, а, б). Образуется сеть фибрина I, в котором молекулы фибрин-мономера последовательно расположены друг за другом (рис. 192, в). По мере отщепления фибринопептидов B эта сеть уплотняется, так как на центральном домене освобождаются дополнительные участки,

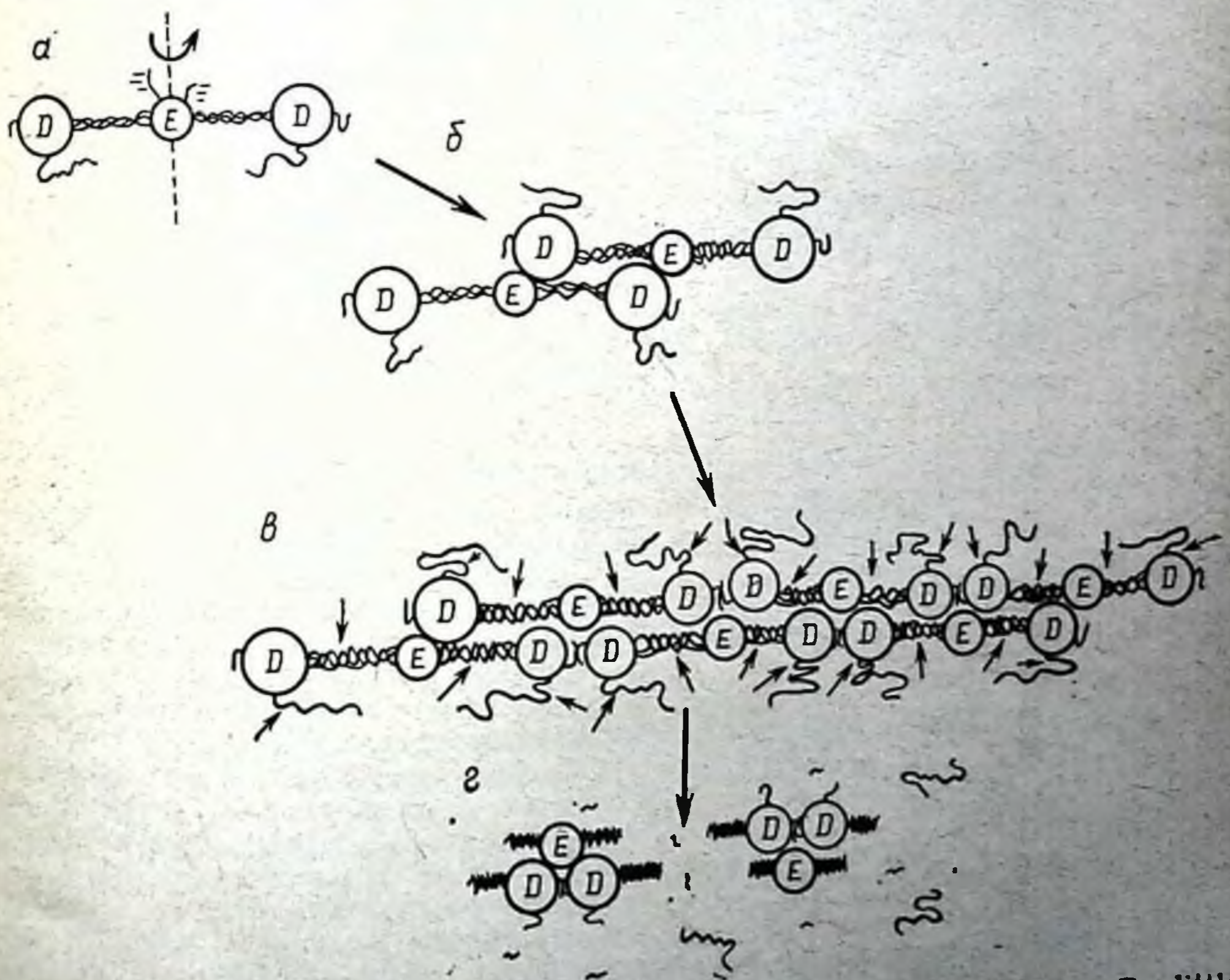


Рис. 192. Образование фибрина и его протеолиз плазмином (по R. F. Doolittle, 1980). Стрелками обозначены места атаки плазмина (объяснение см. в тексте).

способные взаимодействовать с комплементарными областями крайних доменов соседних молекул фибрин-мономеров.

Фибрин II, образующийся в результате отторжения фибринопептидов А и фибринопептидов В, отличается от фибрина I большей толщиной и прочностью фибрилл, меньшей пористостью геля. Полимеризация фибрин-мономеров заметно ускоряется в присутствии ионов Ca^{2+} благодаря их влиянию на электростатическое ориентирование взаимодействующих молекул. Это выражается в ускорении времени полимеризации фибрин-мономеров в присутствии CaCl_2 . В образовании фибрина решающая роль принадлежит водородным связям, которые могут быть разрушены в концентрированных растворах мочевины, в растворах кислот и других соединений с регенерацией фибрин-мономеров. Комплексы гепарина с белками и аминами также вызывают деполимеризацию фибрин-полимеров, что является проявлением их неферментативной «фибринолитической» активности. Фибрины I и II довольно легко разрушаются протеолитическими ферментами крови и не способны полноценно выполнять гемостатическую функцию. Стабилизация фибрина осуществляется под действием фибрин-стабилизирующего фактора, ф. XIIIa.

Полимеры фибрина способны сорбировать тромбин уже спустя несколько секунд после их образования. Концентрация фермента внутри сгустка более чем в 10 раз превышает его концентрацию в растворе. Адсорбционно-иммобилизованный на фибрине тромбин в меньшей степени проявляет свертывающую активность, поэтому можно говорить об антитромбиновой активности фибрина. Диффузия тромбина из фибринового сгустка протекает исключительно медленно, но ускоряется по мере разрушения последнего, при этом свертывающая активность тромбина остается практически неизменной.

3. Стабилизация фибрина происходит под действием ф. XIIIa транспептидазы, катализирующей образование изопептидных связей между γ - γ и α - α -цепями за счет остатков лизина (донор) одной молекулы фибрин-мономера и остатков глутамина (акцептор) другой молекулы (рис. 193). Участки стабилизации фибрина сконцентрированы в С-концевых областях α - и γ -цепей крайних доменов. Момеры в фибрине ориентированы таким образом, что крайние домены двух различных молекул находятся в непосредственной близости, что обуславливает образование прочных ковалентных связей между цепями, расположенными антипараллельно (см. рис. 192). Поскольку каждая из γ -цепей содержит один остаток лизина-донора и один остаток глутамина-акцептора, цепи оказываются соединенными в димер двумя γ -глутамил- ϵ -лизил-изопептидными связями. В α -цепях находится по два остатка лизина-донора и глутамина-акцептора. Это значит, что в образовании изопептидных связей между α -цепями принимают участие более чем две цепи, поэтому в отличие от γ -цепей α -цепи образуют за счет стабилизации мультимерное множество.

Хотя при оптимальных условиях стабилизации образуется шесть изопептидных связей в расчете на одну молекулу фибрин-мономера, для стабилизации фибрина достаточно двух-трех изопептидных связей на 1 молекулу фибрин-мономера. В процессе стабилизации в первую очередь димеризуются γ -цепи, а затем, более медленно, происходит мультимеризация α -цепей.

Стабилизированный фибрин морфологически не отличается от нестабилизированного, однако имеет большую прочность и более резистентен к действию протеолитических ферментов, что делает его способным выполнять гемостатическую функцию при нарушении целостности сосудистой стенки и угрозе кровопотери. Гемостатические свойства фибринового сгустка зависят также от

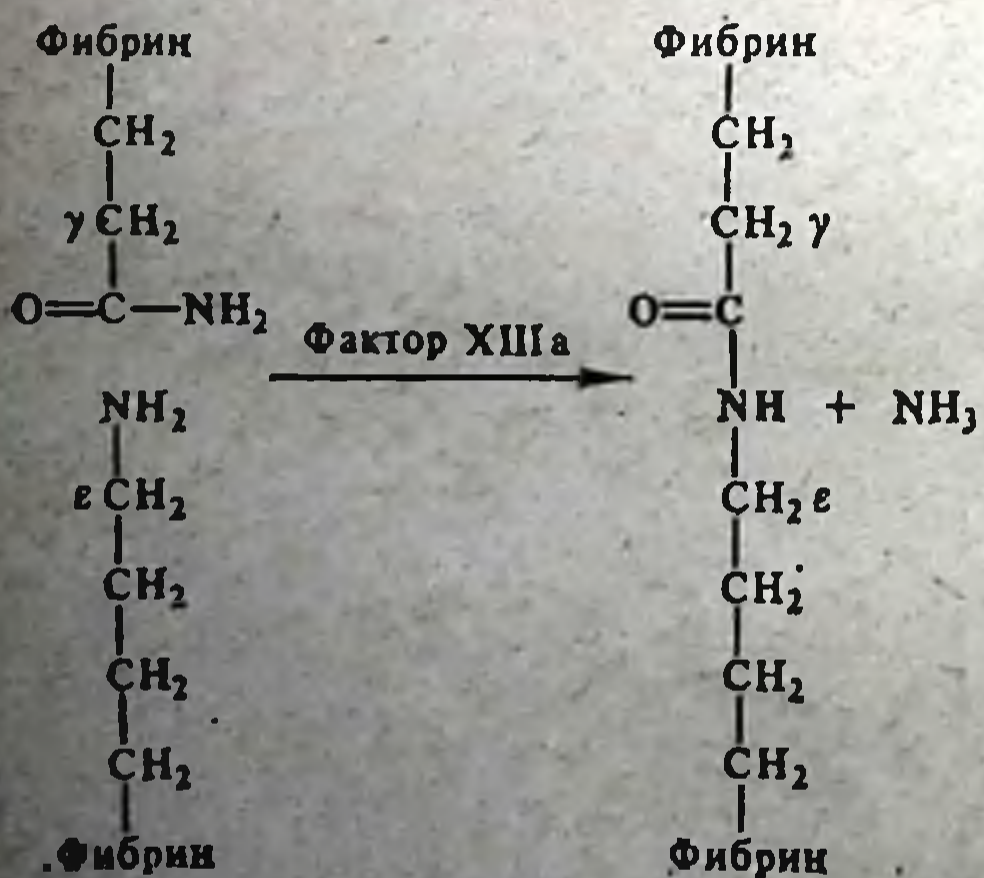


Рис. 193. Стабилизация фибрина фактором XIIIa (образование межмолекулярной γ -глутамил- ϵ -лизил-изопептидной связи)

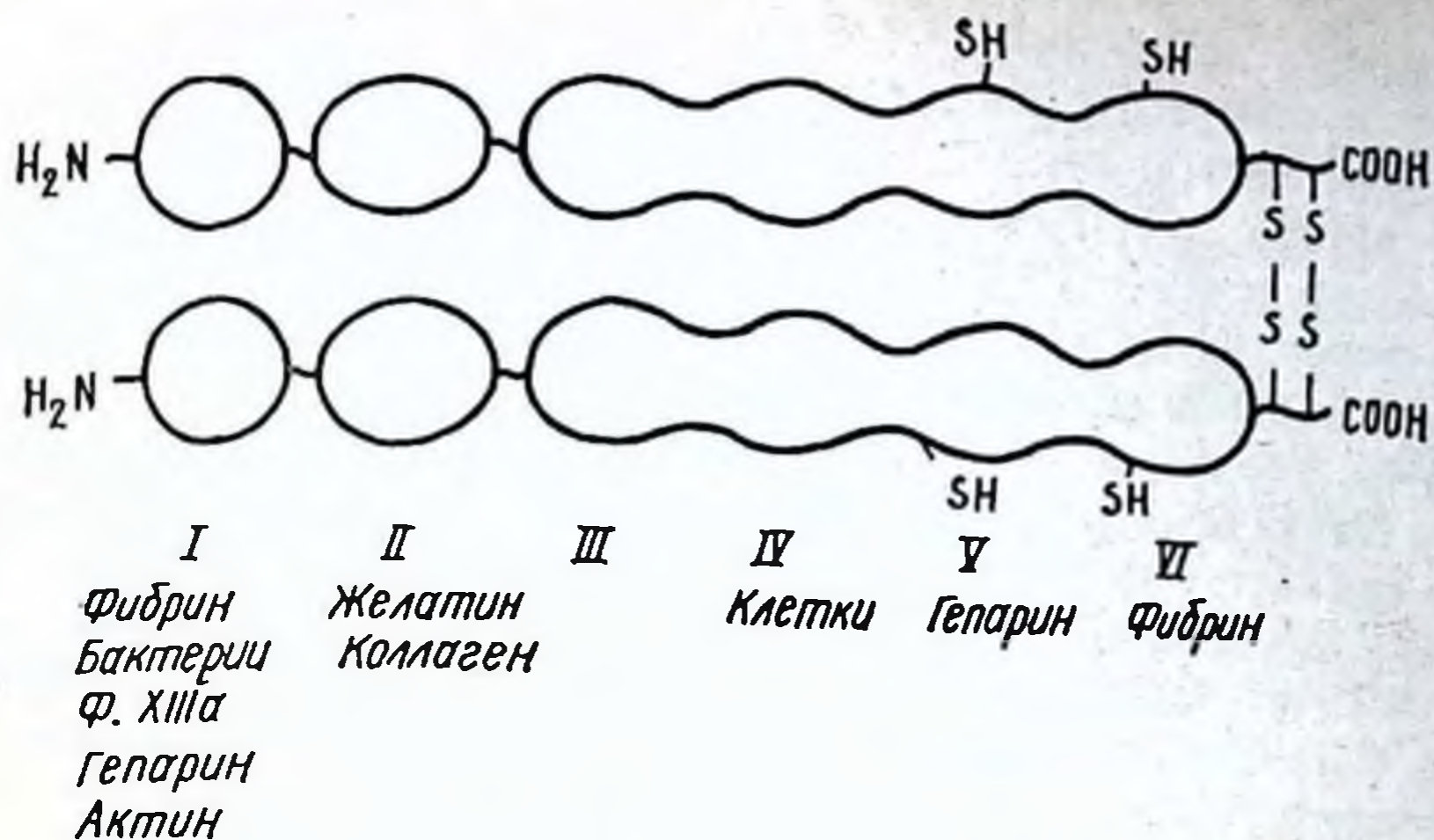


Рис. 194. Модулярная структура молекулы фибронектина. Показана локализация участков связывания с клетками и различными соединения (I—VI) (по R. O. Hynes, K. M. Gamada, 1982)

включенных в его структуру форменных элементов крови, прежде всего тромбоцитов, а также лейкоцитов и эритроцитов.

Связывание фибрина с клетками происходит через посредство *фибронектина* — высокомолекулярного белка плазмы крови и клеток (см. табл.), кофактора многих физиологических процессов. Его характеризует способность связываться с широким набором лигандов: белков (фибрин, ф. XIII, коллаген, ацетилхолинэстераза, некоторые компоненты комплементарной системы и др.), небелковых соединений (глюкозаминогликаны, ДНК, полиамины) и клеточных поверхностей. Связывание фибронектина с лигандами определяется структурой его доменов (рис. 194). При образовании фибрина в плазме крови 20—50% фибронектина оказывается соединенным с ним как путем нековалентной адсорбции, так и посредством ковалентного связывания, которое катализируется ф. XIIIa. Кроме того, фибронектин обеспечивает распластывание тромбоцитов, адгезированных на поверхности субэндотелия и представляет собой высоко тромбогенную поверхность, на которой происходит «рост» тромба.

Цель работы. Выделить ф. XIII из бычьей плазмы и определить его активность в исходной плазме и во фракциях 3 и 5 после активации тромбином в присутствии CaCl_2 . Поскольку субстратом ф. XIIIa является фибрин-мономер, его выделение представляет самостоятельную часть работы.

Задача. Выделение и активация фактора XIII плазмы крови и определение его активности

Методика. Необходимые реактивы. 1,34%-ный раствор оксалата Na; насыщенный при комнатной температуре раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; концентрированный (25%-ный) аммиак; 0,15 М раствор KCl; 0,5 М KCl; 0,1 н. HCl; 1 н. HCl; физиологический раствор; 1,5%-ный раствор CH_3COOH ; 20%-ный раствор монохлоруксусной кислоты; боратный буфер, pH 7,6 (525 мл 0,05 М раствора тетрабората Na

смешивают с 450 мл 0,1 н. HCl и доводят его по потенциометру рН до 7,6); ацетатный буфер, рН 5,2 (400 мл 0,02 М CH_3COONa смешивают со 100 мл 0,02 М CH_3COOH и по потенциометру доводят его рН до 5,2); 10%-ный раствор мочевины; 0,3%-ный раствор фибрин-мономера в 10%-ной мочеvine, приготовленной на ацетатном буфере, рН 5,2; буфер Палитча; смесь для активации ф. XIII; 20%-ный раствор монохлоруксусной кислоты.

Буфер Палитча: смешивают 12 частей 0,05 М раствора тетрабората Na и 88 частей раствора борной кислоты, содержащей NaCl (12,404 г борной кислоты и 2,927 NaCl на 1 л воды, рН 7,6).

Смесь для активации ф. XIII. 10 мг тромбина растворяют в 5 мл раствора буфера Палитча и смешивают с 2 мл 0,025 М раствора CaCl_2 . Такое количество смеси необходимо лишь для одного определения.

Получение фибрин-мономера. Исходным материалом для получения фибрин-мономера является фибриноген. С помощью тромбина его переводят в фибрин-полимер, который растворяют в мочеvine, а затем снова превращают в полимер фибрина при снижении концентрации мочевины в 10 раз. Многократно повторяя эту операцию, освобождают фибрин-мономер от примесей внесенного извне тромбина и от небольших количеств стабилизированного фибрин-полимера, который мог возникнуть благодаря примеси в фибриногене ф. XIII.

Готовят 500 мл 0,3—0,4% (по белку) раствора фибриногена в боратном буфере. Помешивая раствор стеклянной палочкой, добавляют к нему 10 мл раствора тромбина в этом же буфере (2 мг/мл). Спустя 30 мин собирают образовавшийся фибрин, наматывая его на стеклянную палочку, тщательно отжимают, промывают в физиологическом растворе и растворяют в 50—60 мл 10%-ной мочевины, приготовленной на 0,02 М ацетатном буфере, рН 5,2. Из оставшегося раствора, при стоянии его в течение нескольких часов, собирают дополнительно небольшое количество фибрина.

Растворяют фибрин перемешиванием на магнитной мешалке при комнатной температуре. Для более быстрого растворения предварительно разрезают фибрин на кусочки. Нерастворившийся белок отделяют фильтрованием через многослойный марлевый фильтр, а раствор фибрин-мономера разбавляют 400 мл физиологического раствора и спустя 3 мин добавляют 100 мл боратного буфера. Через 1—2 ч сгусток вновь собирают на палочку, промывают физиологическим раствором и растворяют в 30 мл мочевины. Проводят переосаждение фибрин-мономера 2—3 раза. После последнего растворения в мочеvine проверяют чистоту препарата и при удовлетворительном результате используют его в эксперименте. Раствор фибрин-мономера хранят при $+4^\circ\text{C}$.

Определение степени чистоты фибрин-мономера. Двумя параллельными пробами определяют концентрацию и степень чистоты фибрин-мономера. **Проба 1** — определение концентрации белка: 0,2 мл препарата фибрин-мономера добавляют к 5 мл 1,5%-ной

CH_3COOH . Проба II — определение концентрации полимеризующегося фибрин-мономера: 0,2 мл препарата фибрин-мономера добавляют к 0,9 мл медиалового буфера, pH 7,2 (его приготовление см. в теме I).

Инкубируют смесь 30 мин при 37°C . Образовавшийся сгусток собирают, наматывая на стеклянную палочку, отжимают, высушивают на фильтровальной бумаге и переносят в пробирку с 5 мл 1,5%-ной CH_3COOH . Определяют поглощение проб I и II на СФ при 280 и 320 нм. Рассчитывают содержание фибрин-мономера (мг%) по формуле (см. тему I, метод Белицера).

Ход работы. 1. Выделение ф. XIII. 1. Приступая к выделению ф. XIII, внимательно изучить методику и не забыть оставить по 5 мл исходной плазмы, фракций 3 и 5 для дальнейшего определения в них удельной активности ф. XIII. Пробы хранить в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$.

2. Кровь, взятую с консервантом (1,34%-ный раствор оксалата Na) в соотношении 9:1, отцентрифугировать при 2000 об/мин в течение 50 мин.

3. Добавить к плазме при постоянном помешивании насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 20%-ного насыщения. Предварительно довести pH раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 7,0 с помощью 25%-ного аммиака. Для насыщения до 20% на каждые 100 мл плазмы требуется 25 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при комнатной температуре. Перемешать полученную смесь в течение 1 ч.

4. Центрифугировать суспензию в течение 15 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отбросить. Осадок растворить в 0,15 М растворе KCl. Полученный белковый раствор называется фракцией 1 (для более быстрого растворения использовать магнитную мешалку).

5. Довести pH во фракции 1 с помощью 0,1 н. HCl до 5,4. Выпадающий осадок фибрина отбросить. Добавить насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 16%-ного насыщения (pH раствора также предварительно должен быть доведен до 5,4 с помощью 1 н. HCl). На каждые 100 мл раствора добавить 20 мл $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При добавлении соли смесь постоянно помешивать.

6. Намотать образующийся осадок на стеклянную палочку и отжать его. После центрифугирования в течение 15 мин при 2000 об/мин собрать дополнительный осадок. Растворить весь осадок при перемешивании в 0,5 М KCl в объеме, равном 1/15 исходного объема плазмы. Для более быстрого растворения осадок разрезать чистыми ножницами на мелкие части. Полученный раствор называется фракцией 2.

7. Добавить к фракции 2 по каплям насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0, до 16%-ного насыщения (на каждые 100 мл раствора — 20 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Образующийся осадок намотать на палочку. После центрифугирования в течение 15 мин при 2000 об/мин собрать дополнительный осадок. Весь осадок растворить в 0,15 М растворе KCl. Объем растворителя составляет 1/20 часть первоначального объема плазмы. Полу-

ченный белковый раствор называется фракцией 3. Отобрать из этого раствора пробу 5 мл и хранить ее в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$. Эта проба необходима для определения в ней удельной активности ф. XIII.

8. Для отделения ф. XIII от фибриногена фракцию 3 прогреть в термостойкой колбе с плоским дном или в термостойком стакане в водяной бане при 56°C не более 3 мин. При этом фибриноген денатурируется и выпадет в виде резиноподобного осадка. После прогрева быстро поместить колбу в холодную баню (охлаждающую смесь лед плюс соль приготовить заранее) для охлаждения ее до $+4^{\circ}\text{C}$. Удалить денатурированный фибриноген, отжимая через многослойный марлевый фильтр. Фильтрат, содержащий ф. XIII, вновь поместить в ледяную баню. Фильтрат называется фракцией 4.

9. Добавить к фракции 4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0, до 36%-ного насыщения (55 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на каждые 100 мл фракции). После перемешивания в течение 1 ч на холоду собрать осадок центрифугированием в течение 30 мин при 2000 об/мин и растворить в 5—10 мл физиологического раствора.

10. Диализовать белковый раствор в течение 18 ч (на ночь) против 100-кратного объема физиологического раствора для удаления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. После диализа центрифугировать в течение 15 мин при 2000 об/мин, осадок отбросить. Надосадочную жидкость, представляющую собой ф. XIII, хранить при $+4^{\circ}\text{C}$ (фракция 5).

Определение активности ф. XIII. 1. Из 0,2 мл препарата, содержащего ф. XIII, приготовить разведения в пробирках с физиологическим раствором: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 и т. д. Практически разведения делать так: в ряд пробирок (пробирки Сали, средние), обозначенных номерами 1, 2, 3 и т. д., налить по 0,2 мл физиологического раствора. В 1-ю пробирку внести 0,2 мл препарата ф. XIII или испытуемой плазмы. Перемешав содержимое пробирки три раза (втягивая пипеткой раствор и выдувая его), отобрать из нее 0,2 мл и перенести в следующую пробирку и т. д. Из последней пробирки 0,2 мл раствора удалить. Таким образом концентрация ф. XIII в каждой последующей пробирке будет в два раза меньше, чем в предыдущей.

2. В каждую пробирку внести 0,1 мл 0,3%-ного раствора фибрин-мономера и 0,7 мл смеси для активации ф. XIII. Инкубировать в течение 15 мин при 37°C , после чего в каждую пробирку добавить по 0,4 мл монохлоруксусной кислоты и оставить пробирки при комнатной температуре на 10 мин. Отметить последнюю пробирку, в которой наблюдается полная стабилизация сгустка, т. е. ту пробирку, где сгусток фибрин-полимера не растворился. Такое разведение ф. XIII содержит 1 ед. активности в 1 мл. Для того чтобы определить, сколько единиц содержится в 1 мл исходного препарата ф. XIII, надо умножить разведение на 5 (так как для определения использовали 0,2 мл препарата).

3. Определив концентрацию белка в препарате ф. XIII по ме-

тоду Лоури, выразить его специфическую активность в единицах на 1 мг белка.

Обработка результатов. Оформляют в виде таблицы и представляют для исходной плазмы и фракций 3 и 5: объем (мл); содержание белка (мг/мл), выход белка (%), общее количество белка (мг), удельную активность ф. XIIIa (ед./мг белка); степень очистки.

ТЕМА V. АКТИВАЦИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА В ПЛАЗМИН. ФИБРИНОЛИЗ

Фибринолиз и тромболизис — процессы ферментативного расщепления плазмином фибриновых сгустков и тромбов до растворимых в крови продуктов. Активация фибринолиза достигается превращением плазминогена в сериновый протеолитический фермент *плазмин* под действием тканевого, сосудистого и кровяных активаторов, также являющихся сериновыми протеазами. Этот процесс контролируется ингибиторами активаторов и ингибиторами плазмينا, к последним относятся белки плазмы крови: α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин, C1-инактиватор, а также антитромбин III (см. табл.). Активаторы плазминогена делятся на внешние и внутренние (рис. 195). К *внешним* относятся тканевой и сосудистый активаторы, весьма близкие по структуре (две субъединицы, связанные S—S-связью, с мол. массой около 60 000) и, возможно, представляющие один и тот же белок. Они обнаружены в эндотелиальных клетках и в субэндотелии сосудистой стенки, в тканях различных органов и секретах. Эти активаторы секретируются в кровь при физической нагрузке, различных стрессорных состояниях организма, травмах. Особенно высокий уровень тканевого-сосудистого активатора обнаруживается в крови внезапно погибших людей. Важным свойством внешних активаторов плазминогена является их высокое сродство к фибрину, который выступает в качестве регуляторного белка, резко усиливая скорость активации плазминогена в плазмин.

Внутренние активаторы плазминогена непосредственно зависят от контактной стадии свертывания крови, что свидетельствует об одновременной активации свертывающей и фибринолитической систем. Среди внутренних активаторов плазминогена важное место принадлежит калликреину плазмы крови, хотя



Рис. 195. Пути активации плазминогена:
ВМК — высокомолекулярный кининоген; в скобках указаны кофакторы реакции

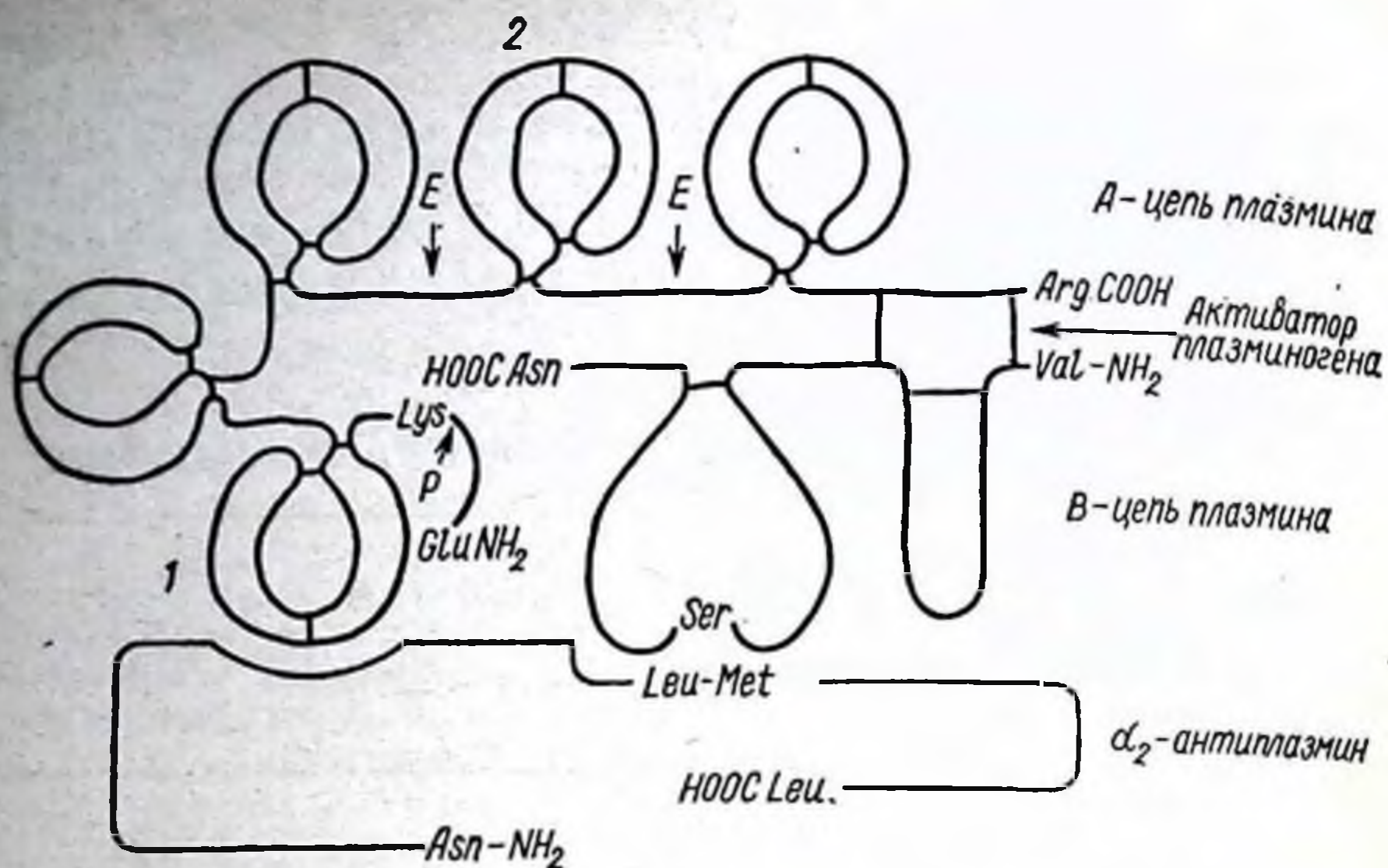


Рис. 196. Взаимодействие плазмина с α_2 -антиплазмином (по D. Collen, 1980):

1, 2 — специфические области связывания лизина; стрелками обозначены места расщепления плазмином (P) и другими ферментами (E)

ф. β XIIa и XIa также обладают способностью активировать плазминоген в плазмин. Поскольку регуляция фибринолиза имеет важное клиническое значение, в медицинской практике широко используют экзогенные активаторы плазминогена: урокиназу, получаемую из мочи, и стрептокиназу — продукт β -гемолитического стрептококка. В отличие от урокиназы стрептокиназа не обладает собственной протеолитической активностью, но она стимулирует конформационные изменения молекулы плазминогена, в результате которых формируется субстратсвязывающий участок активного центра, обеспечивающий активацию плазминогена в плазмин.

Активация плазминогена заключается в ограниченном протеолизе одной аргинил-валиновой пептидной связи, поэтому молекула плазмина состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью, молекулярная масса фермента не отличается от молекулярной массы профермента (см. табл.). Возникший плазмин способен воздействовать на молекулу плазминогена и отщеплять от N-концевой области полипептид, состоящий из 76 или 77 аминокислотных остатков (пептид преактивации). При этом вместо глутаминовой кислоты на N-конце плазминогена появляется лизин (рис. 196). Лизил-плазминоген быстрее чем глутамил-плазминоген активируется с образованием плазмина, также имеющего на N-конце остаток лизина. Таким образом, существуют две формы плазминогена и две формы плазмина.

В плазминогене и плазмине существует пять взаимногомологичных крендель-подобных доменов, образованных при участии S—S-связей фрагментами полипептидной цепи с весьма подобной аминокислотной последовательностью (рис. 196). Домены-крендели плазминогена подобны двум доменам-кренделям протромбина (см. рис. 190). Эти совпадения свидетельствуют не только о дупликациях генов в процессе эволюции этих белков, но и об общем генетическом происхождении предшественников свертывающего и фибринолитического ферментов. Домены расположены в N-концевой части плазминогена и после активации оказываются в тяжелой А-цепи плазмина (рис. 196).

Домены определяют физиологические функции плазминогена и плазмина, в них расположены участки высокого и низкого сродства к лизину (лизин-связывающие участки). Кроме лизина эти же участки способны специфически связывать ЕАКК, причем сродство к ней особенно велико. Лизин-связывающие участки обеспечивают специфическое связывание плазминогена с фибрином. В фиб-

риновом сгустке 4% плазминогена остаются прочно адсорбированными, и только ЕАКК способна ослабить взаимодействие плазминогена с фибрином. Благодаря лизин-связывающим участкам плазмин остается сорбированным на фибрине после активации и практически не инактивируется своим специфическим ингибитором α_2 -антиплазмином, поскольку эти же участки связывания с лизином необходимы для полноценного взаимодействия плазмينا с ингибитором (рис. 196). В плазме крови плазмин всегда находится в неактивном состоянии благодаря комплексообразованию с α_2 -антиплазмином. В этом комплексе фермент может расщепить специфическую лейцил-метиониновую пептидную связь в молекуле ингибитора, но карбонильная группа лейцина остается соединенной с серином каталитического центра фермента. Эта связь довольно прочная, но природа ее окончательно не изучена, образуется ли тетраэдрическое промежуточное соединение или эфирная связь, не известно.

Тканевой-сосудистый активатор плазминогена, благодаря особенностям своей структуры, как и плазминоген, прочно связывается с фибрином. Активация плазминогена происходит на поверхности фибрина с высокой скоростью, и фибрин лизируется под действием иммобилизованного на его поверхности плазмина (рис. 197).

Стабилизированный фибрин значительно медленнее, чем нестабилизированный, расщепляется плазмином, однако начальные стадии протеолиза обоих белков и фибриногена практически одинаковы. В первую очередь от α -цепей крайних доменов отщепляется 27-членный С-концевой пептид и от β -цепи центрального домена с N-конца — 27-членный пептид (в случае фибрина) и 42-членный (в случае фибриногена). Образуются «ранние», или X-продукты деградации фибриногена или фибрина. На следующих этапах протеолиза гидролизуются

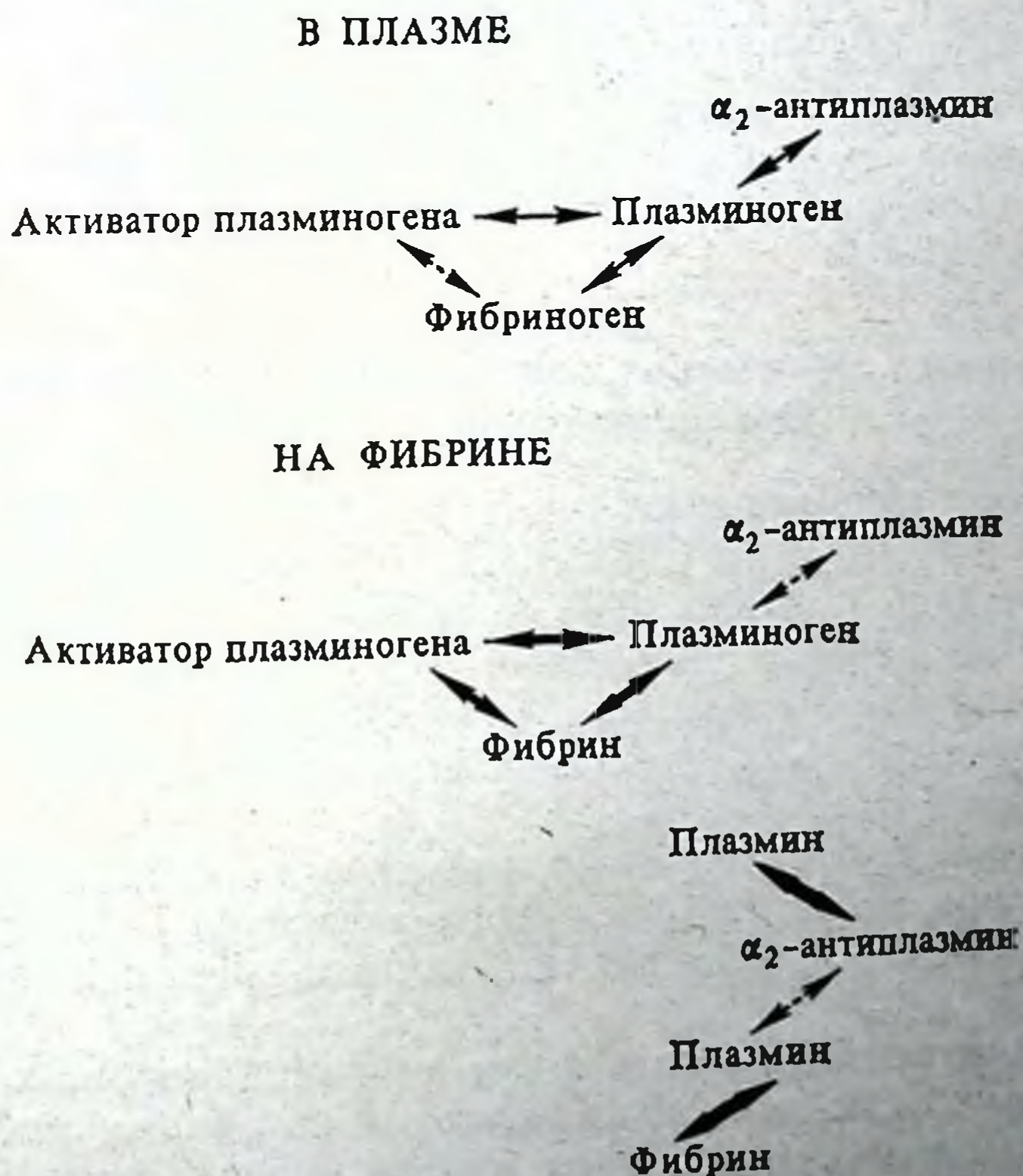


Рис. 197. Взаимодействие между компонентами, обеспечивающими физиологическую регуляцию фибринолиза (толщина стрелок отражает степень сродства между отдельными белками) (по D. Collen, 1980)

пептидные связи в участках, соединяющих домены. В результате протеолиза плазмином фибриногена и нестабилизированного фибрина «поздние» продукты деградации представлены D- и E-доменами. При деградации стабилизированного фибрина сохраняются участки γ-цепей, участвующие в образовании ковалентно-связанных димеров, поэтому продукты деградации стабилизированного фибрина представлены D-димерами, как правило, в комплексе с одним E-доменом (см. рис. 192, 2).

Высокомолекулярные продукты деградации, особенно X-продукты, — активные ингибиторы полимеризации фибрин-мономеров благодаря их способности конкурировать с фибрин-мономерами за участки полимеризации фибрина. Кроме того, они ингибируют адгезию, агрегацию и реакцию высвобождения тромбоцитов. Низкомолекулярные пептиды — продукты деградации фибриногена и фибрина, усиливают действие брадикинина, ангиотензина, адреналина и серотонина на сердце и сосуды, увеличивают их проницаемость.

Наряду с плазминовой фибринолитической системой регуляция фибринолиза в организме осуществляется также при участии фибринолитических ферментов лейкоцитов. Хотя «ранние» продукты протеолиза этими протеазами несколько отличаются от плазминовых, конечными продуктами также являются D- и E-домены.

Успешный поиск новых эффективных и легко доступных фибринолитических препаратов привел к получению из непатогенного гриба *Aspergillus oryzae* ферментов «Бриназа» (Швеция) и «Окраза» (ГДР), а из непатогенного гриба *Trichotecium roseum* — ферментного препарата «Триаза» (СССР), который не только растворяет фибрин, но и активирует плазминоген в плазмин.

Цель работы. Выделить из плазмы крови быка плазминоген и проактивировать его в плазмин предварительно полученной из мочи урокиназой или препаратом тканевого активатора, выделенным из сердца свиньи. Очистить плазмин гелевой фильтрацией и проанализировать фибринолитическую и казеинолитическую активности исходного раствора плазмина и его фракций.

Задача. Выделение плазминогена и его активация. Фракционирование плазмина

Методика. Необходимые реактивы. 53,3%-ный этанол, охлажденный до -20°C ; 10 М CH_3COOH ; 4 М ацетатный буфер, pH 4,0; физиологический раствор; 0,05 н. H_2SO_4 ; 1 н. NaOH ; 1 н. HCl ; 0,005 н. HCl ; раствор урокиназы (см. тему I); 1 М Na_2HPO_4 ; 0,3%-ный (по белку) раствор фибриногена в физиологическом растворе; раствор тромбина (2—5 мг/мл физиологического раствора); сефадекс Г-75.

Подготовка сефадекса и наполнение колонки. Принимая во внимание, что при набухании 1 г сухого сефадекса Г-75 объем геля составляет 12—15 мл, взвешивают необходимое количество декстрана.

Суспендируют сефадекс в воде, добавляя порошок в воду при перемешивании стеклянной палочкой, и оставляют набухать в течение ночи. Взмучивают осадок в воде и после осаждения основной массы декантируют надосадочную жидкость с мельчайшими частицами геля. Повторяют декантацию до исчезновения мельчайших частиц в надосадочной жидкости. Сливают воду и заливают сефадекс тем раствором, который избран для элюции белка с ко-

лонки, в данном случае 0,005 н. HCl, pH 3,5; хорошо перемешивают. Сливают кислоту и заливают новой порцией.

Можно проводить отмучивание мелких частиц сефадекса от основной массы не в воде, а в 0,005 н. HCl.

Колонку длиной 40 см и диаметром около 2 см укрепляют в строго вертикальном положении. Вставляют в основание колонки перфорированный диск из плексигласа, помещают на него диск из фильтровальной бумаги.

Наполняют колонку наполовину 0,005 н. HCl, предварительно удалив пузырек воздуха из пространства под основанием колонки. Выливают густую суспензию геля в колонку. После того как у основания колонки осядет слой сефадекса высотой 2—5 см, открывают кран колонки, чтобы жидкость вытекала медленно, и продолжают наполнение колонки сефадексом. Критерием правильного наполнения является наличие совершенно горизонтальной поверхности сефадекса. После того как все частицы осели, помещают на гель диск фильтровальной бумаги. Промывают колонку раствором. *При работе с колонками следует помнить, что нельзя допускать подсыхания верхнего слоя геля.*

Уравновешивают колонку 0,005 н. HCl в течение 2—4 ч (по возможности лучше оставить уравновешивание на ночь), пропуская кислоту со скоростью 0,5 мл/мин.

Ход работы. 1. Выделение плазминогена. Исходным материалом служит надосадочная жидкость, отделенная от фибриногена (фракция I) после осаждения его этанолом (см. тему I «Фибриноген»). К этой надосадочной жидкости, охлажденной до -5°C , добавить 53,3%-ный этанол, охлажденный до -20°C , до 20%-ного насыщения при pH 6,5, т. е. на 1 л добавить 360 мл 53,3%-ного этанола, 0,88 мл 10 М CH_3COOH , 0,44 мл ацетатного буфера и 2,3 мл 96%-ного этанола. Контролировать значение pH с помощью потенциометра. Отстаивать 1 ч при температуре -5° . Осадок, содержащий кроме плазминогена протромбин и γ -глобулины, отделить центрифугированием при 2000 об/мин при температуре -5°C и растворить в 30—50 мл физиологического раствора.

2. Довести в растворе этой фракции содержание этанола до 25% (pH 7,2) при охлаждении до -5°C . Для этого добавить 883 мл 53,3%-ного этанола на 1 л раствора. После 2-часового стояния при -5°C отделить осадок центрифугированием при -5°C в течение 20 мин при 2000 об/мин. Почти весь плазминоген и протромбин осаждаются в этой фракции.

3. Растворить осадок в физиологическом растворе и довести концентрацию этанола до 17%, pH 5,2: добавить на каждый литр раствора 495,8 мл охлажденного до -20°C этанола, 0,88 мл CH_3COOH , 0,44 мл ацетатного буфера и 2,3 мл 96%-ного этанола. Оставить смесь при 0°C на ночь. Осадок собрать центрифугированием при 0°C в течение 20 мин при 2000 об/мин (фракция III).

4. Экстрагировать плазминоген из сырого осадка фракции III в течение 10 мин 10-кратным объемом 0,05 н. H_2SO_4 при механическом помешивании и комнатной температуре. Суспензию центрифуги-

гировать при 2000 об/мин в течение 30 мин, осадок отбросить. Надосадочную жидкость довести до pH 11,0 1 н. NaOH и через 3 мин (точно по часам) до pH 5,3 1 н. HCl. При крайних значениях pH денатурируют инертные белки, сопутствующие плазминогену. Оставить раствор на 3 ч при 0°C для полного выпадения осадка.

5. Довести pH суспензии до 2,0 1 н. HCl. Надосадочную жидкость, содержащую плазминоген, отделить центрифугированием при 2000 об/мин в течение 1 ч при 0°C. Этот раствор, называемый раствором А, стабилен при pH 2,5 в течение недели.

Активация плазминогена. 1. Довести раствор А плазминогена до pH 5,2—5,4 1 н. NaOH. Собрать осадок центрифугированием в течение 20 мин при 2000 об/мин при 0°C и суспендировать в 4-кратном объеме дистиллированной воды. Для полного освобождения от балластных белков добавить 1 н. HCl до pH 5,0. Спустя 1 ч удалить осадок центрифугированием при тех же условиях. Довести фильтрат до pH 7,6 1 М Na_2HPO_4 и активировать.

2. Активацию вести при комнатной температуре. Добавить раствор урокиназы к раствору плазминогена в объемном соотношении 1 : 20 или 1 : 10 в зависимости от активности фермента.

3. О ходе активации судить по уменьшению времени лизиса при 37°C смеси, состоящей из 0,4 мл раствора фибриногена (0,5%-ный раствор по белку, определенному по методу Лоури), 0,2 мл инкубируемой смеси и 0,2 мл раствора тромбина. В контрольной пробе, содержащей 0,4 мл фибриногена, 0,2 мл физиологического раствора и 0,2 мл раствора тромбина, время свертывания должно быть около 30 с, что регулируется концентрацией тромбина (от 2 до 5 мг/мл).

4. Отбирать пробы из инкубируемой смеси через каждые 10 мин инкубации. По достижении максимальной активности смесь охладить и довести pH раствора до 5,4 1 н. HCl. Оставить смесь на 1 ч при 0°C. Собрать осадок центрифугированием на холоду при 2000 об/мин. Небольшую часть осадка хранить в холодильнике при —20°C. Основную часть осадка растворить в 0,005 н. HCl, pH 3,5, и нанести на колонку с сефадексом Г-75.

Фракционирование плазмина на колонке с сефадексом Г-75. Приготовить 2%-ный раствор плазмина (по белку) в 0,005 н. HCl, pH 3,5. Медленно нанести 4 мл раствора пипеткой на поверхность геля. После того как раствор профильтруется, обмыть стенки колонки несколько раз с помощью пипетки небольшими порциями 0,005 н. HCl, pH 3,5. Начать элюцию этим же раствором при комнатной температуре. Фракции элюата собирать на коллекторе по 3 мл при скорости вытекания не более 0,5 мл/мин. Определить во всех фракциях элюата содержание белка, фибринолитическую активность на стандартных и прогретых фибриновых пластинах, казеинолитическую активность (см. тему I).

Обработка результатов. Результаты представляют в виде графика, на котором по оси абсцисс откладывают объем элюируемых фракций или обозначают их номер, а по оси ординат — концентрацию белка, казеинолитическую активность в казеинолитических единицах, а также фибринолитическую активность и активность

активатора плазминогена по зонам лизиса фибриновых пластин. Для исходного раствора плазмина и для фракций с максимальными активностями определяют следующие параметры: объем (мл); концентрацию белка (мг/мл); общее количество белка (мг); выход белка во фракциях (в % к исходному раствору плазмина); удельную казеинолитическую активность (кЕ/мг белка); удельную фибринолитическую активность (мм²/мг белка); степень очистки (% к исходному раствору плазмина).

ТЕМА VI. НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Активация противосвертывающей системы тромбином. Работами Б. А. Кудряшова и сотрудников лаборатории физиологии и биохимии свертывания крови Московского государственного университета показано, что жидкое состояние крови в организме регулируется нейрогуморальной противосвертывающей системой.

Фермент тромбин при определенном его избытке, превышающем ингибиторные способности плазменных антитромбинов, возбуждает хеморецепторы кровеносных сосудов. Это возбуждение по афферентным путям рефлекторной дуги достигает нейронов, расположенных в ретикулярной формации продолговатого мозга. Импульсы от этих структур по эфферентным путям передаются эффекторным органам, в результате чего из тканевых депо в кровоток поступают гепарин и активатор плазминогена (рис. 198).

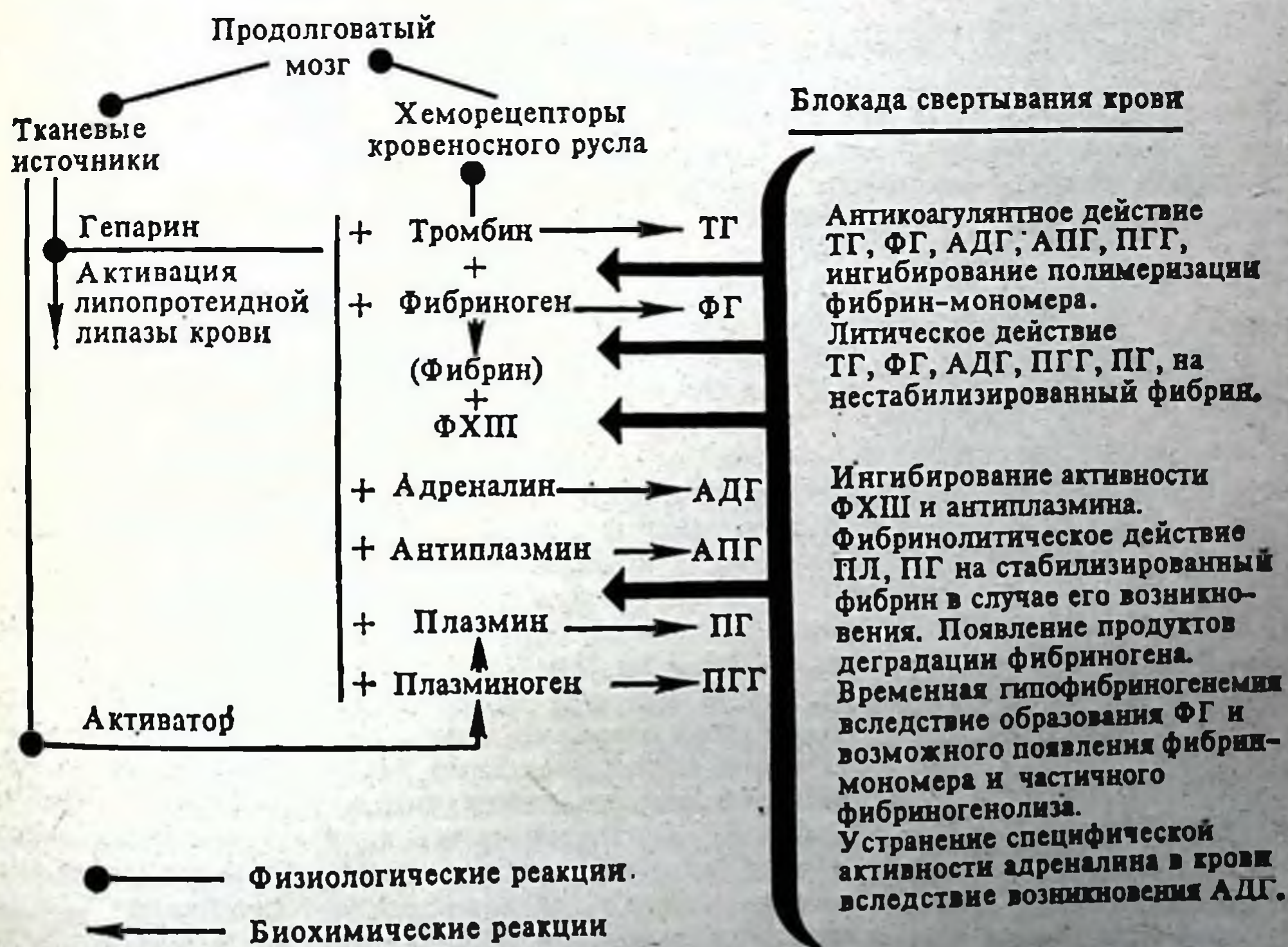


Рис. 198. Рефлекторно-гуморальный механизм второй противосвертывающей системы (по Кудряшову Б. А., 1972):

ТГ, ФГ, АДГ, АПГ, ПГГ, ПГ — комплексы гепарина с тромбином, фибриногеном, адреналином, антиплазмином, плазминогеном и плазмином соответственно

Гепарин образует комплексные соединения с белками плазмы крови: фибриногеном, протромбином, тромбином, ф. X, XIII, плазминогеном, плазмином, антитромбином III и др. и с аминами: адреналином, норадреналином, серотонином и др. Эти комплексы диссоциируют спонтанно или в присутствии таких соединений, как серотонин, протамин-сульфат, Ca^{2+} и др. В большей или меньшей степени комплексы гепарина способны вызывать деполимеризацию нестабилизированного фибрина и ингибировать полимеризацию фибрин-мономеров, поэтому в их присутствии замедляется образование фибрина. Кроме того, они ингибируют агрегацию тромбоцитов. В результате выброса в кровь активаторов плазминогена образуется плазмин, который гидролизует фибриноген (и фибрин) до продуктов деградации. Последние так же, как комплексные соединения гепарина, препятствуют полимеризации фибрин-мономеров и замедляют агрегацию тромбоцитов.

Рефлекторная природа противосвертывающей системы доказана многочисленными экспериментами по перерезкам проводящих путей центральной и вегетативной нервной системы, по выключению ретикулярной формации и парасимпатической нервной системы. Во всех этих опытах наблюдалось выключение противосвертывающей системы, и внутривенное введение животным тромбина приводило к гибели их от тромбоза.

Перфузия тромбином изолированной от системного кровообращения почки кролика с сохраненной иннервацией или синокаротидной зоны кролика, а также каротидного лабиринта лягушки также приводит к активации противосвертывающей системы, что выражается в увеличении антикоагуляционной и фибринолитической активностей крови. У крыс, в головной мозг которых были вживлены никромовые электроды, раздражение электрическим током ретикулярной формации продолговатого мозга вызывало увеличение биоэлектрической активности клеток ретикулярной формации и двигательной области коры головного мозга параллельно с повышением фибринолитического и антикоагуляционного потенциалов крови.

Основная роль в регуляции противосвертывающей системы принадлежит центральным образованиям головного мозга и в первую очередь гипоталамусу. Эфферентный путь включает переднее и латеральное поля гипоталамуса, обоеидное ядро продолговатого мозга, блуждающие нервы и эффекторные органы, выделяющие гуморальные агенты: гепарин и активатор плазминогена. При явлениях депрессии противосвертывающей системы (атеросклеротические изменения сосудов, наркоз, выключение проводящих путей и т. д.) возникают состояния предтромбоза и тромбоза. При этом в крови животных понижается содержание комплексов гепарина с фибриногеном и адреналином в ответ на стресс (рис. 199).

С целью предупреждения тромботических осложнений при депрессии противосвертывающей системы используют препараты, имитирующие функции ее гуморальных агентов: гепарин, активаторы плазминогена и плазмин.

При внутривенном введении тромбина ответная реакция противосвертывающей системы проявляется на 5—7-й мин. На 1—2-й мин обнаруживается гиперкоагуляция как за счет непосредственного взаимодействия с кровью, так и путем активации симпатической нервной системы серотонином и адреналином, которые высвобождаются тромбином из тромбоцитов. В литературе широко распространено мнение, что при внутривенном введении тромбина или тканевого тромбопластина животным всегда первично возникает гиперкоагуляция, а гипокоагуляция носит вторичный характер и является результатом внутрисосудистого свертывания.

Цель работы. Продемонстрировать гипокоагуляцию и гиперфибринолиз в плазме

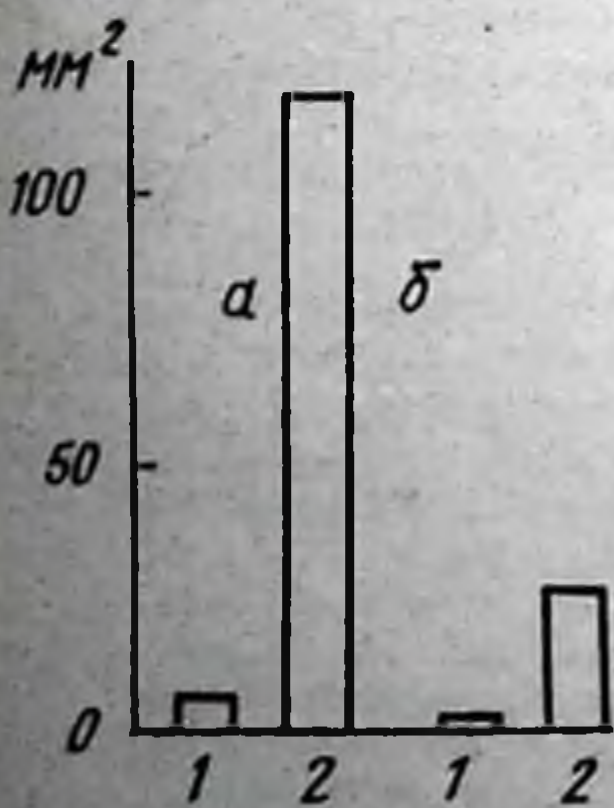


Рис. 199. Неферментативная «фибринолитическая» активность плазмы крови у крыс, содержащихся на естественном рационе (а) и атерогенной диете (б) до (1) и после (2) стресса (по В. А. Кудряшову, 1975)

крови животных спустя 5—7 мин после внутривенного введения тканевого тромбопластина. Показать, что эти эффекты определяются состоянием нервной системы животных.

Задача 1. Изменение показателей свертывающей и противосвертывающей систем крови крыс после внутривенного введения тканевого тромбопластина

При внутривенном введении тканевого тромбопластина происходит активация протромбина в тромбин в соответствии с внешним механизмом свертывания крови (см. рис. 184). В ответ на избыток тромбина меняются параметры свертывающей и противосвертывающей систем крови таким образом, что вслед за стадией гиперкоагуляции (1—2 мин) наступает гипокоагуляция с максимумом на 5—7-й мин, которая затем снижается до нормы.

Необходимые реактивы. Тканевой тромбопластин (см. тему I); физиологический раствор; 3,8%-ный раствор цитрата Na; 0,025 M CaCl_2 .

Ход работы. 1. Ввести препарат тканевого тромбопластина группе ненаркотизированных крыс в такой дозе, чтобы на 5—7-й мин выявить удлинение общего времени свертывания крови в 2—4 раза или более.

2. Инъецировать подобранную дозу тромбопластина опытной группе животных, контрольной ввести такой же объем физиологического раствора.

3. Отобрать по 1 мл крови до введения препарата и спустя 1—2, 5—7 и 40 мин после введения (см. тему I).

4. Определить в пробах плазмы, полученных от каждого животного, время рекальцификации плазмы, и если значения оказываются близкими для каждой из временных групп, объединить их и определить следующие показатели: уровень свертываемого фибриногена по методу Бидвелл или Белицера; антитромбиновую активность плазмы; неферментативную фибринолитическую активность плазмы и предварительно выделенного комплекса фибриноген-гепарин (в точном соответствии с методикой, описанной в теме I для выделения фибриногена); фибринолитическую активность по методу Аструпа для плазмы и эуглобулиновой фракции с оценкой активности плазмина и активаторов плазминогена. Записать на коагулографе или тромбоэластографе время рекальцификации плазмы. Определить агрегацию тромбоцитов (необходима плазма, богатая тромбоцитами, полученная специально из крови контрольных и опытных групп животных после введения им физиологического раствора и тромбопластина).

Обработка результатов. Представить в виде таблицы перечисленные выше параметры для контрольной и опытной групп животных «до» и «после» введения физиологического раствора и тромбопластина.

Задача 2. Выключение противосвертывающей системы наркозом и внутривенным введением аминазина

При действии аминазина или эфирного наркоза блокируется нервная регуляция противосвертывающей системы и животные погибают от тромбоза при внутривенном введении им такой дозы тромбина или тканевого тромбопластина, которую выдерживают ненаркотизированные животные. Тканевой тромбопластин при внутривенном введении активирует протромбин до тромбина в соответствии с внешним механизмом свертывания крови (см. рис. 184).

Необходимые реактивы. 2,5%-ный раствор аминазина; эфир для наркоза; тканевой тромбопластин (см. тему I), физиологический раствор.

Ход работы. 1. Отработать на нескольких животных такую дозу тканевого тромбопластина (0,8—1,0 мл), которая способна вызвать активацию противосвертывающей системы (см. тему I). Об активации судить по увеличению общего времени свертывания крови (в 2—4 раза и более) на 5—7-й мин после внутривенного введения тромбопластина. Необходимо на 5 животных выявить четкий эффект активации противосвертывающей системы.

2. Наркотизировать 2-ю группу из 10 животных эфиром с помощью маски и спустя 4—6 мин пяти из них ввести внутривенно ту же самую дозу тромбопластина, остальным — равный объем физиологического раствора.

3. 3-й группе из 10 животных ввести внутривенно раствор аминазина из расчета 0,08 мл на 200 г массы. Спустя 20 мин пяти животным ввести тромбопластин, остальным — физиологический раствор.

4. Определить у всех выживших животных общее время свертывания крови на 5—7-й мин после введения.

5. Погибших животных вскрыть и проанализировать сосуды, сердце, легкие, печень и почки на предмет тромбообразования.

Обработка результатов. Представляют описание каждой из групп животных и данные по определению общего времени свертывания крови.

ТЕМА VII. ТРОМБОЗ. ДЕЙСТВИЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ И ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Внутрисосудистое тромбообразование приводит к расстройству кровообращения. В формировании тромбов играют роль как системные (нейрогуморальные), так и местные (сосудистые) факторы. Развитие атеросклероза и образование атеросклеротических бляшек также способствует образованию тромбов. Дисфункция противосвертывающей системы и повышенная возбудимость свертывающей создают в организме тот общий фон, на котором различные сосудистые факторы могут провоцировать тромбообразование. Травмирование эндотелия сосудистой стенки в результате гипертензии, гипоксии, возрастных и других изменений стимулирует образование тромбов.

С целью предупреждения образования или разрушения тромбов, возникших в результате повреждения внутренней поверхности сосуда, в этой области локально создают избыток антитромботических или тромболитических агентов. Для этого используют как внутривенное введение, так и направленный транспорт липосом, наполненных необходимым лекарственным препаратом. Из тром-

болитических препаратов наиболее перспективным является тканевой активатор плазминогена. Препаратами, обладающими противотромботическим действием, являются гепарин, комплекс его с антитромбином III, синтетические ингибиторы тромбина, стабильные аналоги простациклина и др.

Для испытания действия антитромботических и тромболитических препаратов используют модели тромбообразования у животных. Распространенным методом является деэндотелизация участка сосудистой стенки. Активные факторы свертывания, введенные внутривенно в достаточном количестве, также могут провоцировать тромбообразование: тромбогенные свойства активных факторов свертывания выражены тем сильнее, чем выше их положение в каскаде свертывания (см. рис. 184). Так, чтобы в 50% случаев вызвать тромбоз у кроликов, достаточно ввести внутривенно $18 \cdot 10^{-12}$ М ф. IXa/kg массы тела, но $12 \cdot 10^{-11}$ М ф. Xa. Тромбин в тех же условиях способен вызвать тромбоз лишь в дозе $11 \cdot 10^{-10}$ М. Источником тромбогенных факторов XIIa, XIa, IXa, Xa является контактно-активированная сыворотка крови. При внутривенном введении она провоцирует тромбообразование в области венозного стаза, который обычно создается наложением лигатуры на изолированный участок вены. Препараты, введенные внутривенно перед инъекцией сыворотки, препятствуют тромбообразованию в области венозного стаза. Эту патофизиологическую модель тромбоза используют также и для оценки активности тромболитических препаратов: их вводят в интактную вену после того, как тромб уже сформировался. Полная реканализация сосуда свидетельствует о тромболитическом эффекте.

Цель работы. Выявить антитромботическое действие гепарина и тромболитическое действие урокиназы и тканевого активатора плазминогена

Задача 1. Оценка антитромботического действия гепарина

Гепарин, кислый мукополисахарид, компонент метакроматических гранул тучных клеток является антикоагулянтом широкого спектра действия, поскольку усиливает ингибирование антитромбинами протеаз плазмы крови (см. табл.). Он стимулирует секрецию активатора плазминогена из эндотелиальных клеток и образует комплексные соединения с белками крови и аминами. Комплекс фибриноген-гепарин ингибирует полимеризацию фибрин-мономеров и агрегацию тромбоцитов и вызывает деполимеризацию нестабилизированного фибрина.

Необходимые реактивы. Сыворотка крови; физиологический раствор; гепарин фирмы «Рихтер», Венгрия (20 ед./мл физиологического раствора); 3,8%-ный раствор цитрата Na; 2,5%-ный раствор аминазина.

Ход работы. 1. Использовать крыс массы 150—180 г, 5 — для контроля, 10 — для опыта (две группы по 5 животных).

2. Фиксировать крыс привязыванием на доске (см. тему 1). Сделать разрезы кожи в области шеи и отпрепаровать обе яремные вены таким образом, чтобы оставался свободным участок левой вены длиной 1 см. Анастезировать животных введением в правую вену раствора аминазина из расчета 0,06 мл/200 г массы.

3. Спустя 20 мин 5 контрольным животным ввести в правую яремную вену по 0,5 мл. физиологического раствора, а 10 опытным — гепарин в объеме 0,5 мл.

4. Контрольным животным и одной группе из 5 опытных животных через 30 мин, а другой опытной группе — через 3 ч ввести в ту же вену сыворотку в объеме 0,3 мл.

5. Через 45 с на левую вену, в области отпрепарованного участка сосуда, наложить два плотных металлических зажима на рас-

стоянии 1 см друг от друга. Шейную область накрыть ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

6. Спустя 30 мин снять зажимы, определить визуально наличие тромба и оценить степень проходимости сосуда с помощью тонкого стеклянного крючка. Тромб при отсутствии проходимости сосуда обозначить как 2 единицы тромбообразования; тромб при частичной проходимости сосуда — 1 единицей, полную проходимость сосуда при отсутствии тромба обозначить как 0 единиц.

7. После снятия зажимов взять из правой вены у каждой крысы по 2 мл крови для определения антитромбиновой активности и частичного тромбопластинового времени плазмы крови (см. тему I).

Обработка результатов. Представляют результаты по определению антитромбиновой активности гепарина (см. тему I). Оценивают в условных единицах антитромботический эффект препарата, введенного внутривенно в разные сроки перед введением сыворотки. Представляют значения антитромбиновой активности и частичного тромбопластинового времени плазмы крови животных после снятия зажимов.

Задача 2. Оценка тромболитического действия препаратов урокиназы и тканевого активатора плазминогена

Тканевой активатор — внешний, а урокиназа — экзогенный активатор плазминогена (см. тему V). Урокиназа обладает слабым сродством к фибрину и поэтому является менее эффективным тромболитическим агентом.

Методика. Необходимые реактивы. Препарат тканевого активатора плазминогена; препарат урокиназы (см. тему I); 2,5%-ный раствор аминазина; физиологический раствор; 3,8%-ный раствор цитрата Na; ацетон; 0,3 М CH_3COONa , pH 4,2; насыщенный при $+4^\circ\text{C}$ раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; насыщенный раствор BaCl_2 ; гепарин (20 ед/мл физиологического раствора).

Выделение тканевого активатора плазминогена. 1. 500 г мышц сердца свиньи отделяют от сосудов и оболочки и промывают дистиллированной водой. Разрезают на куски и замораживают в холодильнике на -20°C на 1—2 суток.

2. Размораживают, пропускают через мясорубку и обезвоживают, добавляя равный объем ацетона. После отстаивания мутный раствор выливают и заливают свежей порцией растворителя. Повторяют процедуру не менее трех раз. *Работать с ацетоном следует под тягой.*

3. Освобождают осадок от растворителя на воронке Бюхнера, помещают на фильтровальную бумагу и высушивают на воздухе под тягой.

4. Заливают высушенный материал равным объемом CH_3COONa , перемешивают на холоду с помощью мешалки, избегая образования пены, и оставляют на ночь для более полного экстрагирования. Осадок удаляют центрифугированием на холоду при 2000 об/мин в течение 30 мин.

5. К охлажденному до $+4^\circ\text{C}$ экстракту добавляют равный объем насыщенного при $+4^\circ\text{C}$ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и оставляют на

ночь в холодной комнате. Осадок, выпавший при 50%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, собирают центрифугированием на холоду при 2000 об/мин в течение 40—60 мин и растворяют в примерно равном объеме дистиллированной воды.

6. Диализуют сначала против дистиллированной воды, многократно ее меняя, а затем против физиологического раствора, до отрицательной реакции на ионы SO_4^{2-} (после смешивания 1 капли анализируемого раствора с 1 каплей насыщенного раствора BaCl_2 в присутствии ионов сульфата появляется белый осадок BaSO_4). Осадок, выпавший во время диализа, удаляют центрифугированием, а раствор доводят до pH 7,2—7,4 и используют в работе.

Ход работы. 1. Вызвать тромбообразование у крыс (см. задачу 1): исследуемые препараты вводить не перед инъекцией сыворотки, а после того, как тромб сформировался и полностью отсутствует проходимость сосуда. В этом необходимо убедиться после снятия зажимов.

2. Препараты урокиназы и тканевого активатора плазминогена ввести в объеме 0,5 мл/200 г массы тела в правую яремную вену (в левой вене тромб) и наблюдать за тромболизисом. Полная rekanализация сосуда свидетельствует о разрушении тромба. Чтобы быть уверенными в действительном лизисе тромба (он может переместиться вместе с кровью), снять зажимы и заменить их лигатурой, неплотно перевязывая ее (оставляя диаметр около 2 мм).

3. Если тромб не лизирует в течение 3—4 ч, увеличить объем вводимых препаратов до 1,0—1,5 мл. Можно усилить тромболитический эффект гепарином. Для этого группе животных ввести одновременно (через одну иглу, но разными шприцами) с анализируемым препаратом раствор гепарина из расчета 20 ед. активности на 1 крысу и наблюдать за тромболизисом. Одной контрольной группе животных с тромбами вводить гепарин, другой — физиологический раствор. Использовать не менее 5 животных в каждой из контрольных и опытных групп.

4. После тромболизиса у опытных животных у каждой из крыс опытной и контрольной групп взять по 2 мл крови и из порции плазмы выделить эуглобулиновую фракцию.

5. Определить фибринолитическую активность плазмы и эуглобулиновой фракции на стандартных и прогретых фибриновых пластинах в соответствии с методом Аструпа.

Обработка результатов. Представляют результаты по определению удельной фибринолитической активности выделенных препаратов урокиназы и тканевого активатора плазминогена на стандартных и прогретых фибриновых пластинах по методу Аструпа. Оценивают тромболитический эффект препаратов, введенных внутривенно животным в различных дозах. Представляют данные по определению фибринолитической активности плазмы и эуглобулиновой фракции плазмы крови, взятой у животных после лизиса тромбов в сравнении с контрольной группой животных.

Рекомендуемая литература: [1]; [4]; [10]; [12]; [18]; [21]; [24]; [39]; [52].

ТЕМА VIII. ИНГИБИТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ИЗ КРОВОСОСУЩИХ. МЕДИЦИНСКАЯ ПИЯВКА *HIRUDO MEDICINALIS*

Кровососущие, относящиеся к различным классам (черви, ракообразные, паукообразные, насекомые, круглоротые, млекопитающие), вырабатывают активные вещества, препятствующие свертыванию крови. Эти вещества, секретируемые слюнными железами кровососущих, известны давно: табанин слепней, ре-
дукин клопов семейства хищнецов, иксодин и аргазин клещей. Наиболее извест-
ным является гирудин, входящий в состав секрета слюнных желез медицинских
пиявок *Hirudo medicinalis*.

Впервые Д. Хайкрафт (1884) обнаружил, что водные экстракты головной области медицинских пиявок препятствуют свертыванию крови. В 1903 г. актив-
ный препарат из слюнных желез пиявок был назван гирудином. До открытия
гепарина гирудин был единственным широко применявшимся антикоагулянтом.
В качестве источника гирудина использовали или водные экстракты из головок
пиявок, или высушенные препараты гирудина-сырца. Разработка методов очист-
ки гирудина, изучение его молекулярных характеристик и биохимических свойств
связаны с именем Ф. Марквардта (ГДР). Им было установлено, что гирудин
является высокоспецифическим ингибитором фермента тромбина, который обра-
зует с ним стехиометрический (1:1) комплекс ($K_i = 10^{-12} \text{M}$). Это свойство ги-
рудина обуславливает антитромботический эффект при внутривенном введении
животным.

Биологическая активность секрета слюнных желез и экстрактов из меди-
цинских пиявок не ограничивается только ингибированием тромбина. Так,
Х. Фритц (ФРГ) в гомогенатах пиявок обнаружил, выделил и охарактеризовал
ингибиторы трипсина — бделлины, а также эглины — ингибиторы химотрипсина,
субтилизина и эластазы.

Нами¹ показано, что в секрете слюнных желез медицинских пиявок при-
сутствуют ингибиторы фермента калликреина, блокирующие контактную стадию
свертывания крови, а также мощные ингибиторы агрегации тромбоцитов и инги-
биторы адгезии тромбоцитов на поверхности коллагена. Кроме того, в секрете
обнаружены липолитические ферменты и соединения, влияющие на систему
комплемента.

Изучение свойств компонентов секрета слюнных желез медицинских пия-
вок позволило приблизиться к пониманию механизмов, обеспечивающих несвер-
тываемость крови при насасывании ее пиявками. Присосавшись к телу живот-
ных или человека, пиявка с помощью трех челюстей прокусывает кожу, нару-
шая целостность кровеносных сосудов. При этом она выбрасывает секрет слюн-
ных желез, который покрывает раневую поверхность сосудов, блокируя началь-
ные стадии гемостаза: адгезию тромбоцитов, их агрегацию и активацию контакт-
ной стадии внутреннего механизма свертывания крови.

Вытекающая из ранки кровь после снятия пиявки некоторое время не свер-
тывается за счет попадания в нее небольших количеств секрета с поверхности
поврежденного сосуда. По мере вытекания крови секрет вымывается и восста-
навливаются тромбогенные свойства поврежденной сосудистой стенки. Хотя
секрет не ингибирует активацию внешнего механизма свертывания крови, гиру-
дин предохраняет кровь от свертывания, блокируя тромбин, который образу-
ется под действием тканевого фактора из разрушенных тканей пораненного
сосуда. Гистаминоподобные вещества и гиалуронидаза, содержащиеся в сек-
рете, повышают проницаемость капилляров и обеспечивают возможность диффу-
зии секрета пиявок в межклеточное пространство, создавая тем самым условия
для извлечения пиявкой крови из соседних сосудов. Давно известно, что экст-
ракты из пиявок способны понижать кровяное давление. Такой же эффект
обнаружен нами и у секрета слюнных желез пиявок. Очевидно, это его свойство

¹ Совместно с сотрудниками Всесоюзного кардиологического научного центра
АМН СССР, Института биоорганической химии АН СССР, Института медицин-
ской и биологической химии АМН СССР.

направлено на поддержание определенного тонуса сосудов, который обеспечивает оптимальные условия для насыщения пиявкой крови. Следует обратить также внимание на то, что пиявочный секрет обладает бактериостатическим действием в отношении ряда патогенных микроорганизмов.

Секрет слюнных желез (одна пиявка содержит около 20 мкл секрета) выбрасывается на протяжении всего периода кровососания. В очень небольших количествах он попадает в систему преимущественно капиллярного кровотока, чем и обусловлено (наряду с кровоизвлечением) его лечебное действие при гирудотерапии. Большая часть секрета вместе с насосанной пиявкой кровью (до 10—12 мл) попадает в желудочно-кишечную полость пиявки, препятствуя свертыванию крови, вызывая гемолиз эритроцитов и ограничивая действие ферментов: экзо- и эндопептидаз. Этим обеспечивается низкая скорость переваривания крови, что позволяет пиявке «питаться» насосанной кровью в течение даже полутора лет. В изучение свойств пиявочной крови внесли свой вклад русские врачи К. Дьяков, Н. Кузнецов и другие в конце прошлого и в начале этого века. Ф. Пастернацкий успешно использовал пиявочную кровь для переливания больным.

Таким образом, медицинская пиявка является источником уникальных ингибиторов свертывания крови и тромбообразования. Высокое сродство этих ингибиторов к активным компонентам гемостатического процесса обусловлено спецификой добывания и переваривания крови, представляющей единственный источник питания медицинской пиявки.

Цель работы. Сравнить антитромбиновое, антисвертывающее (по отношению к плазме крови) и антитромботическое действие экстрактов из головной области и туловищ медицинских пиявок.

Задача. Получение экстрактов из головной области и туловищ медицинских пиявок. Сравнение их антитромбиновой, антисвертывающей (по отношению к плазме крови) и антитромботической активностей

Методика. Необходимые реактивы. Этанол, физиологический раствор.

Получение экстрактов из пиявок *Hirudo medicinalis*. 10—12 пиявок массой около 2 г, голодавших не менее трех месяцев, помещают на 24 ч в этанол. Отсекают ножницами головную область на уровне 8—10 кольца (примерно 12 мм). Ножницами измельчают отдельно головки и туловища пиявок, заливают равным объемом физиологического раствора и растирают в ступке или гомогенизируют. Отделяют экстракты от твердых частиц центрифугированием при 2000 об/мин в течение 30 мин без охлаждения. Твердый материал повторно заливают физиологическим раствором, перемешивают и оставляют в термостате на 2—3 ч при 37°C. Снова центрифугируют. Водные вытяжки хранят при +4°C.

Ход работы. 1. Определить антитромбиновую активность концентрированных и разведенных физиологическим раствором в 2, 5, 10 раз экстрактов из головок и туловищ пиявок (см. тему I). Концентрацию тромбина можно увеличить так, чтобы время образования фибринового сгустка в контроле составляло 8—10 с.

2. Определить время рекальцификации плазмы в присутствии неразбавленных и разбавленных физиологическим раствором пиявочных экстрактов (0,2 мл плазмы, 0,1 мл экстракта и 0,2 мл 0,032 М CaCl_2 ; см. тему I); в контроле экстракт заменить физиоло-

гическим раствором. Заблокировать тромбином гирудин. Для этого к порции экстракта добавлять концентрированный раствор тромбина до тех пор, пока антитромбиновая активность экстракта не приблизится к контролю. Определить время рекальцификации плазмы в присутствии такого экстракта.

3. Проанализировать антитромботическое действие экстрактов из головок и туловищ пиявок, используя патофизиологическую модель тромбообразования (см. задачу 1 темы VII). Контрольной группе из 5 крыс ввести за 1 ч до внутривенной инъекции сыворотки 0,3 мл физиологического раствора и оценить степень тромбообразования.

4. Одной опытной группе животных, состоящей из 5 крыс, ввести внутривенно по 0,3 мл экстракта из головок пиявок и стимулировать тромбообразование спустя 1 ч после инъектирования сыворотки. Оценить степень тромбообразования. Второй и третьей опытным группам крыс (по 5 животных в каждой группе) ввести по 0,3 мл экстракта из головок пиявок и стимулировать тромбообразование спустя 4 ч (для 2-й группы) и 24 ч (для 3-й группы) после введения сыворотки. Оценить степень тромбообразования у животных 2-й и 3-й групп.

5. Проанализировать антитромботический эффект экстрактов из туловищ пиявок на серии опытных групп животных (по 5 крыс каждая), которым за 1, 4 и 24 ч до инъекции сыворотки ввести по 0,3 мл экстракта.

6. Испытать антитромботическое действие обоих экстрактов на модели тромбоза у крыс, стимулированного внутривенным введением им летальной дозы мозгового тромбопластина (см. темы I и VI). Контрольной группе крыс ввести внутривенно по 0,5 мл физиологического раствора, а через 5 мин 1,5—2 мл мозгового тромбопластина. Несколько варьируя дозу тромбопластина, убедиться в ее летальности для 5 крыс.

Обработка результатов. Представляют в виде таблицы данные по определению антитромбиновой активности полученных экстрактов, влиянию их на время рекальцификации плазмы крови. Оценивают в условных единицах (см. тему VII) антитромботический эффект экстрактов из головок пиявок и туловищ, введенных животным за 1, 4 и 24 ч до введения сыворотки. Представляют в процентах степень выживаемости двух опытных групп животных по сравнению с контрольной группой, получавших внутривенно экстракты из головок и туловищ пиявок за 5 мин до введения тканевого тромбопластина.

Т а б л и ц а. Основные характеристики компонентов свертывающей и противосвертывающей систем крови

Название	Содержание в плазме, мкг/мл	Молекулярная масса и количество полипептидных цепей	Активная форма	Инициатор активации	Молекулярная масса и количество полипептидных цепей	Основная функция
Фактор I (фибриноген)	2000 — 4000	340 000 (6) (A α) ₂ (B β) ₂ γ_2	ф. Ia, фибрин-мономер	Тромбин	~ 34 000 (6) $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$	Образование фибрина; агрегация тромбоцитов
Предшественники сериновых протеаз			Сериновые протеазы			
Фактор XII (Ф. Хагемана)	15 — 40	80 000 (1)	ф. α XIIa ф. β XIIa	Спонтанно, калликреин плазмы Калликреин плазмы, ф. α XIIa	80 000 (1) 28 000 (1) 30 000 (2)	Контактная стадия свертывания крови; кининообразование; система комплемента; фибринолиз
Прекалликреин (Ф. Флетчера)	50 — 100	88 000 (1)	Калликреин	ф. α XIIa ф. β XIIa	88 000 (2)	Кининообразование; контактная стадия свертывания крови; фибринолиз
Плазминоген (профибринолизин): глу-плазминоген лиз-плазминоген	160—280	93 000 (1) 85 000 (1)	Глу-плазмин Лиз-плазмин	Активаторы плазминогена	93 000 (2) 85 000 (2)	Фибринолиз; контактная стадия свертывания крови; система комплемента
Фактор XI	2 — 9	124 000 (2)	ф. XIa	ф. XIIa	124 000 (4)	Контактная стадия свертывания крови
Фактор IX (Ф. Кристмаса)	5	57 000 (чел.) (1) 55 400 (быч.) (1)	ф. IXa	ф. XIa, ф. VIIa-тканевой ф.	44 000 (чел.) (2) 43 500 (быч.) (2)	Внутренний механизм свертывания крови

Название	Содержание в плазме, мкг/мл	Молекулярная масса и количество полипептидных цепей	Активная форма	Инициатор активации	Молекулярная масса и количество полипептидных цепей	Основная функция
Фактор VII (проконвертин)	0,5—0,7	50 000 (чел.) (1) 53 000 (быч.) (1)	ф. VIIa	Спонтанно, тканевой ф., факторы: Ха, XIIa, IXa, тромбин, калликреин	48 000 (чел.) (2) 53 000 (быч.) (2)	Внешний механизм свертывания крови
Фактор X (ф. Стюарта-Проуэра)	7 — 10	74 000 (чел.) (2) 55 000 (быч.) (2)	ф. Хаa ф. Хаb	ф. VIIa. тканевой ф.; ф. IXa ф. VIIa. тканевой ф. + аутокатализ	55 000 (чел.) (2) 45 300 (быч.) (2) 50 000 (чел.) (2) 42 600 (быч.) (2)	Общий механизм свертывания крови; активация ф. V и VII; агрегация тромбоцитов
Фактор II, (протромбин)	70 — 170	71 600 (чел.) (2) 72 100 (быч.) (2)	ф. IIa тромбин	ф. Ха	37 400 (быч.) (2) 37 000 (чел.) (2)	Общий механизм свертывания крови; активация ф. V, VIII и XIV; агрегация тромбоцитов; стимулирование эндотелиальных клеток (см. тему III)
Фактор XIV, (белок C)	0,33	62 000 (быч.) (2)	ф. XIVa	Тромбин	62 000 (2)	Инактивация ф. V, Va, VIII, VIIIa; стимулирование фибринолиза
Предшественник тимолинового фермента (транспептидазы)			Тиоловый фермент (транспептидаза)			

Название	Содержание в плазме, мкг/мл	Молекуляр- ная масса и количество полипептид- ных цепей	Активная форма	Инициатор активации	Молекуляр- ная масса и количество полипептид- ных цепей	Основная функция
Фактор XIII	19	320 000 (4) a ₂ b ₂	ф. XIIIa, (фибрин- стабили- зирую- щий фактор)	Тром- бин, ф. Ха	140 000 (2) a ₂	Стабили- зация фиб- рина
<i>Регуля- торные бел- ки</i> Тканевой фактор		43 000 (1)	Ком- плекс с фосфо- липидами 1:450 (ткане- вой тром- боплас- тин) ф. VIIIa			Активаци- я ф. VII, VIIa
Фактор VIII (анти- гемофиличе- ский глобу- лин)	30 — 50	250—300 000 (3)	ф. VIIIa	Тром- бин, ф. Ха	180 000 (3)	Активаци- я ф. IX
Фактор V (проакцел- лерин)	9	330 000 (1)	ф. Va	Тром- бин, ф. Ха	175 000 (2)	Активаци- я ф. X
Белок S	2	69 000 (чел.) (1) 64 000 (быч.) (1)				Активаци- я ф. XIV
Высокомо- лекулярный кининоген (ф. Фитцже- ральда)	70 — 90	120 000(чел.) (1) 76 000 (быч.) (1)	Про- теолизирова- нная фор- ма, лишен- ная кини- нина	Кал- ликреин	120 000(чел.) (2) 76 000 (быч.) (2)	Активаци- я ф. XI
Фибронек- тин	150—720	440 000 (2)				Действие направлено на фибрин, коллаген, гепарин, клетки, ДНК
<i>Ингиби- торы</i>						

Название	Содержа- ние в плазме, мкг/мл	Молекуляр- ная масса и количество полипептид- ных цепей	Активная форма	Инициатор активации	Молекуляр- ная масса и количество полипептид- ных цепей	Основная функция
Антитром- бин III (ко- фактор гепа- рина I)	20 — 30	65 000 (1)	Комп- лекс ан- титром- бин III- гепарин (1:1)	Гепа- рин (сильно)		Ингиби- рует тром- бин, калли- креин, фак- торы: IXa, Xa, XIa, XIIa, плаз- мин
Антитром- бин BM (Binds Mode- rately) (ко- фактор гепа- рина II)	90	65 600 (1)	Комп- лекс ан- титром- бин BM- гепарин (1:1)	Гепа- рин (слабо)		Ингиби- рует тром- бин
α_2 -макро- глобулин	300	725 000 (4)	—	—		Ингиби- рует плаз- мин, калли- креин, тромбин
C1-инакти- ватор	23	104 000 (1)	—	—		Ингиби- рует калли- креин, фак- торы: XIa, XIIa, плаз- мин
α_1 -анти- трипсин	290	54 000 (1)				Ингиби- рует плаз- мин, тром- бин, трип- син, ф. XIa
α_2 -анти- плазмин	100	70 000 (1)				Ингиби- рует плаз- мин, тром- бин, трип- син
Внутрен- ний α_1 -инги- битор трип- сина	50	160 000 (1)	—	—		Ингиби- рует плаз- мин, трип- син
α_1 -анти- химотрипсин	290	54 000 (1)	—	—		Ингиби- рует химо- трипсин, трипсин, плазмин, тромбин

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

К разделам I—IV

1. Анохин П. К. Системные механизмы высшей нервной деятельности. М., 1979.
2. Ажипа Я. И. Нервы желез внутренней секреции и медиаторы в регуляции эндокринных функций. М., 1976.
3. Бабищев В. Н. Нейроэндокринология пола. М., 1981.
4. Батуев А. С. Физиология сенсорных систем. М., 1976.
5. Беритов И. С. Общая физиология нервной и мышечной систем. М., 1966, т. II.
6. Беритов И. С. Структура и функция коры большого мозга. М., 1969.
7. Беритов И. С. К учению о лабиринтных и шейных тонических рефlekсах. — Избр. тр. М., 1975.
8. Беритов И. С. Реципрокная иннервация скелетной мускулатуры при локальном стрихнинном отравлении спинного мозга. — Избр. тр. М., 1975.
9. Бехтерева Н. П. Здоровый и больной мозг человека. Л., 1980.
10. Бонч-Бруевич А. М. Радиоэлектроника в экспериментальной физике. М., 1966.
11. Братусь Т. Н., Козлова М. В., Лебедева В. А. Современные представления о механизме действия химического стимула на вкусовые рецепторы. — В сб.: Сенсорные системы. Л., 1978.
12. Бреже М. Электрическая активность нервной системы. М., 1979.
13. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования. М., 1962.
14. Введенский Н. Е. О соотношении между возбуждением и раздражением при тетанусе. — В сб.: Физиология нервной системы. М., 1952, вып. 2.
15. Введенский Н. Е., Ухтомский А. А. Рефлексы антагонистических мышц при электрическом раздражении чувствующего нерва. — В кн.: И. М. Сеченов, И. П. Павлов, Н. Е. Введенский. Физиология нервной системы. Л., 1952, т. III, ч. I.
16. Ведяев Ф. П., Воробьева Т. А. Модели и механизмы эмоциональных стрессов. Киев, 1983.
17. Войтинский Е. Я., Прянишников В. А. Применение высокочувствительных усилителей постоянного тока для физиологических целей. Л., 1969.
18. Гальберштатас С. Х. Нервная регуляция мышечной деятельности. Вильнюс, 1975.
19. Гуляев П. И. Электрофизиология нервного ствола. — В сб.: Современные проблемы электрофизиологических исследований нервной системы. М., 1964.
20. Гусельников В. И. Электрофизиология головного мозга. М., 1976.
21. Дональдсон П. Электронные приборы в биологии и медицине. М., 1963.
22. Дуринян Р. А. Кортикальный контроль неспецифических систем мозга. М., 1975.
23. Есаков А. И. О периферических механизмах регуляции деятельности вкусового рецепторного аппарата. — В сб.: Сенсорные системы. Л., 1977.
24. Есаков А. И., Дмитриева Т. М. Нейрофизиологические основы тактильного восприятия. М., 1971.
25. Жукова Г. П. Нейронное строение и межнейронные связи мозгового ствола и спинного мозга. М., 1977.
26. Иванова С. Н. Механизмы компенсации двигательных функций после латеральной гемисекции спинного мозга. М., 1980.
27. Ильинский О. Б. Механорецепторы. Л., 1967.

28. Карамян А. И. Эволюция функций мозжечка и больших полушарий головного мозга. М.—Л., 1959.
29. Катц Б. Нерв, мышца и синапс. М., 1968.
30. Клиническая нейрофизиология. Л., 1971 (Руководство по физиологии).
31. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника. М., 1960.
32. Костюк П. Г. Структура и функция нисходящих систем спинного мозга. Л., 1973.
33. Костюк П. Г. Физиология центральной нервной системы. Киев, 1977.
34. Коц Я. М. Организация произвольных движений. М., 1975.
35. Коштова Х. С. Основы сравнительной физиологии. М., 1957, т. 2.
36. Кратин Ю. И., Гусельников В. И. Техника и методика электроэнцефалографии. Л., 1971.
37. Куффлер С., Николс Дж. От нейрона к мозгу. М., 1979.
38. Магнус Р. Установка тела. М.—Л., 1962.
39. Методы клинической нейрофизиологии. Л., 1977.
40. Мещерский Р. М. Методика микроэлектродного исследования. М., 1960.
41. Милнер Н. Физиологическая психология. М., 1973.
42. Мурадян А. Г., Разумихин В. М., Тверецкий М. С. Усилительные устройства. М., 1976.
43. Мэгун Г. Бодрствующий мозг. М., 1965.
44. Науменко Е. В., Попова Н. К. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Новосибирск, 1975.
45. Ноздрачев А. Д. Анатомия кошки. Л., 1973.
46. Общая и частная физиология нервной системы. Л., 1969 (Руководство по физиологии).
47. Общая физиология нервной системы. Л., 1979 (Руководство по физиологии).
48. Окс С. Основы нейрофизиологии. М., 1969.
49. Пляц О. М. Справочник по электровакуумным полупроводниковым приборам и интегральным схемам. Минск, 1976.
50. Регельсон Л. М., Кузнецова А. В., Петибратов А. П. Импульсная техника. М., 1967.
51. Сентаготаш Я., Арбиб М. Концептуальные модели нервной системы. М., 1976.
52. Симонов П. В. Эмоциональный мозг. М., 1981.
53. Сомьен Дж. Кодирование сенсорной информации в нервной системе млекопитающих. М., 1975.
54. Стэси Р. Электроника для биологов и медиков. Л., 1962.
55. Судаков К. В. Биологические мотивации. М., 1971.
56. Тамар Г. Основы сенсорной физиологии. М., 1976.
57. Тасаки И. Проведение нервного импульса. М., 1959.
58. Терентьев П. В. Лягушка. М., 1950.
59. Ухтомский А. А. О показателе лабильности (функциональной подвижности) физиологических приборов. — В сб.: Физиология нервной системы. М., 1952, вып. 2.
60. Физиология головного мозга/Черкес В. А., Олешко Н. Н., Ваколюк Н. И., Луханина Е. П. Киев, 1976.
61. Физиология движений. Л., 1976 (Руководство по физиологии).
62. Физиология сенсорных систем. Л., 1975, ч. 3 (Руководство по физиологии).
63. Физиология эндокринной системы. Л., 1979 (Руководство по физиологии).
64. Хамилтон Л. У. Основы анатомии лимбической системы мозга крысы. М., 1984.
65. Цветкова И. П. Гипоталамус кролика. Стереотаксический и цитоархитектонический атлас. Л., 1978.
66. Частная физиология нервной системы. Л., 1983 (Руководство по физиологии).
67. Челурнов С. А. Ритмические процессы и регуляция жизненных функций организма. — В кн.: Биологические ритмы. М., 1980.

68. *Чепурнов С. А., Чепурнова Н. Е.* Миндалевидный комплекс мозга. М., 1981.
69. *Шеррингтон Ч.* Интегративная деятельность нервной системы. Л., 1969.
70. *Экклс Дж.* Тормозные пути центральной нервной системы. М., 1971.

К разделам V—VIII

1. *Андресенко Г. В.* Фибринолиз. М., 1979.
2. *Ахрем А. А., Кузнецова А. И.* Тонкослойная хроматография. М., 1964.
3. *Бабкин В. П.* Секреторный механизм пищеварительных желез. М., 1960.
4. *Базазьян Г. Г.* Диетический фактор, атеросклероз и система свертывания крови. М., 1982.
5. *Буреш Я., Петрань М., Захар И.* Электрофизиологические методы исследования. М., 1962.
6. *Городецкая Е. А., Копылова Г. Н., Удельнов М. Г.* Внутрисердечный нервный ганглиозный аппарат и его значение в авторегуляции внутрисердечной и общей гемодинамики. — Биол. науки. 1976, № 11.
7. *Гоффман Б., Крейнфилд П.* Электрофизиология сердца. М., 1962.
8. *Дехтярь Г. Я.* Электрокардиография. М., 1955.
9. *Елисеев В. Г., Афанасьев Ю. И., Котовский Е. Ф.* Атлас микроскопического строения клеток, тканей и органов. М., 1970.
10. *Зубаиров Д. И.* Биохимия свертывания крови. М., 1978.
11. *Кабак Я. М.* Практикум по эндокринологии. М., 1968.
12. *Калишевская Т. М.* Регуляция жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1982.
13. *Каменская В. Н., Самонина Г. Е., Удельнов М. Г.* К характеристике афферентной активности сердечных нервов лягушки. — Журн. эволюционной и сравнительной биохимии и физиологии. 1976, т. 12, № 3.
14. *Каменская В. Н., Самонина Г. Е., Удельнов М. Г.* Сравнительно-физиологический анализ функциональной организации рефлексогенной зоны сердца в связи с контролем сердечного ритма. — Успехи современной биологии, 1980, т. 90, вып. 1(4).
15. *Кирпичникова Е. С., Левинсон Л. Б.* Практикум по частной гистологии. М., 1960.
16. *Кириенблат Я. Д.* Практикум по эндокринологии. М., 1969.
17. *Копылова Г. Н., Удельнов М. Г., Соколова Н. А.* Роль внутрисердечной нервной системы в организации местных рефлекторных отношений в сердце. — Физиол. журн. СССР, 1974, № 5.
18. *Кудряшов Б. А.* Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975.
19. *Кулаев Б. С.* Рефлексогенная зона сердца и саморегуляция кровообращения. Л., 1972.
20. *Куффлер С., Никколс Дж.* От нейрона к мозгу. М., 1979.
21. *Лабораторные методы исследования системы гемостаза/Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д., Кузник Б. И., Лакин К. М.* Томск, 1980.
22. *Лемперт Г. Л.* Основы электрокардиологии. М., 1963.
23. *Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н.* Практикум по оперативной хирургии. М., 1968.
24. *Маркосян А. А.* Физиология свертывания крови. М., 1966.
25. *Мецерский Р. М.* Стереотаксический метод. М., 1961.
26. *Ноздрачев А. Д.* Анатомия кошки. Л., 1973.
27. *О новой модели кардио-кардиального рефлекса/Каменская В. Н., Самонина Г. Е., Удельнов М. Г., Чудаков Л. И.* — Физиол. журн. СССР, 1976, т. 62, № 5.
28. *Панков Ю. А., Усвайтова И. Я.* Флюорометрический метод определения 11-оксикортикостероидов в плазме периферической крови. — В сб.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965.
29. *Розен В. Б.* Основы эндокринологии. М., 1984.

30. Самонина Г. Е., Александрова Т. Б., Удельнов М. Г. Некоторые вопросы участия коры больших полушарий в регуляции сердечно-сосудистой системы. — Успехи физиол. наук, 1978, т. 9, № 2.
31. Самонина Г. Е., Удельнов М. Г. Структурно-функциональная организация блуждающих нервов и ее значение в регуляции сердца. — Биол. науки, 1975, № 12.
32. Сербенюк Ц. В., Балежина Н. П. Рефлекторная регуляция эндогенного ритма лимфатического центра лягушки. — Физиол. журн. СССР, 1980, т. 66, № 2.
33. Сербенюк Ц. В., Батыргожина А. А., Лелекова Т. В. Эндогенный ритм лимфатического центра амфибий при интенсивной искусственной синаптической бомбардировке. — Физиол. журн. СССР, 1981, т. 67, № 7.
34. Сербенюк Ц. В., Сычев В. С., Лелекова Т. В. О двухуровневой организации спинального центра лимфатического сердца лягушки. — Биол. науки, 1976, № 7.
35. Сеченов И. М. Избранные произведения. М., 1956, т. 2.
36. Славнов В. Н. Радиоизотопные и радиоиммунологические исследования функций эндокринных желез. Киев, 1978.
37. Современные методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях/Под ред. Н. А. Юдаева. М., 1968.
38. Сперанская Е. Н. Методики операций на собаках и проведение хронических опытов в физиологии. М.—Л., 1953.
39. Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе/Под ред. Е. И. Чазова и В. С. Смирнова. М., 1983.
40. Терентьев П. В. Лягушка. М., 1950.
41. Уголев А. М. Изолированный желудочек по передней стенке. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1957, т. 44, № 7.
42. Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Л., 1971.
43. Успенский Ю. Н. Новая облегченная модификация операции павловского желудка у собаки. — Физиол. журн. СССР, 1954, т. 40, № 4.
44. Удельнов М. Г. Физиология сердца. М., 1975.
45. Удельнов М. Г., Копылова Г. Н. Современные представления о роли вегетативных ганглиев в центральной и местной нервной регуляции внутренних органов. — Биол. науки, 1970, № 4.
46. Удельнов М. Г., Соколова Н. А., Копылова Г. Н. Взаимоотношения между парасимпатической и симпатической иннервацией при регуляторном управлении активностью сердца и других внутренних органов. — Успехи физиол. наук, 1977, № 1.
47. Федотов В. П., Баграмян Э. Р., Алешина Л. В. Методика трансаурикулярного удаления гипофиза у крыс различного веса. — Пробл. эндокрин., 1971, № 2.
48. Физиология кровообращения. Л., 1980 (Руководство по физиологии).
49. Физиология пищеварения. Л., 1974 (Руководство по физиологии).
50. Фолков Б., Нил Э. Кровообращение. М., 1976.
51. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. М., 1975.
52. Хорст А. Молекулярные основы патогенеза болезней. М., 1982.
53. Юдаев Н. А. Химические методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. М., 1961.
54. Korenman S. G. Relation between estrogen inhibitory activity and binding to cytosol of rabbit and human uterus. — Endocrinology. 1970, v. 87, p. 1119—1123.
55. Murphy B. Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro- and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. — J. Clin Endocrinol. a Metab. 1967, v. 127, p. 973—998.
56. Rodbard D. Mathematic of hormone-protein interaction. I. Basic principles. — In: Receptors for reproductive hormones. N. Y.—Lnd., 1973, p. 289—327.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Общие указания к выполнению и оформлению задач. — И. Ф. Прудникова	6

Раздел I

ЭЛЕКТРОННЫЕ ПРИБОРЫ В ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ	8
Л. И. Чудаков	

Основные сведения электротехники и электроники	9
Электронные приборы в электрофизиологических задачах большого практикума	29
Тема I. Усилители биоэлектрических потенциалов (УБП)	34
Тема II. Усилители постоянного тока для микроэлектродных исследований	43
Тема III. Электронные осциллографы	46
Тема IV. Электростимуляторы	48

Раздел II

ФИЗИОЛОГИЯ НЕРВОВ И МЫШЦ И ОБЩАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ	53
---	----

Тема I. Мембранный потенциал. — И. Ф. Прудникова	53
Тема II. Возбуждение и его распространение. — И. Ф. Прудникова	58
Тема III. Электрофизиологическая характеристика лабильности нервно-мышечного препарата. — С. А. Чепурнов, Н. Е. Чепурнова	70
Тема IV. Временное повышение работоспособности мышцы при ритмическом раздражении нерва. — С. А. Чепурнов, Н. Е. Чепурнова	76

Раздел III

ФИЗИОЛОГИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ	84
С. А. Чепурнов, Н. Е. Чепурнова	

Тема I. Общие принципы координированной иннервации мышц (по И. С. Беритову)	85
Тема II. Реципрокная иннервация мышц-антагонистов	92
Тема III. Морфофизиологическое изучение рефлекторной деятельности спинного мозга	100
Тема IV. Спинальное животное	109
Тема V. Изучение сенсомоторной области коры больших полушарий мозга кошки	112
Тема VI. Явление децеребрационной ригидности. Шейные и лабиринтные рефлексы	122
Тема VII. Роль восходящих влияний ретикулярной формации в формировании бодрствующего состояния коры	125
Тема VIII. Функции мозжечка	129
Тема IX. Стереотаксический метод введения электродов в подкорковые структуры	135
Тема X. Хроническая изоляция медиобазального гипоталамуса (по Б. Холасу)	143
	405

Тема XI. Реакция самораздражения у крысы и кролика	145
Тема XII. Электроэнцефалограмма человека	151

Раздел IV

РЕЦЕПЦИЯ РАЗДРАЖЕНИЙ. — Г. Ю. Юрьева

Тема I. Физиология вкусового рецептора	157
Тема II. Тактильные рецепторы	178

Раздел V

ФИЗИОЛОГИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ — Н. А. Келарева, Г. Н. Копылова, Г. Е. Самонина, Н. А. Соколова, Г. С. Сухова, М. Г. Удельнов

Тема I. Проведение возбуждения в сердце	187
Тема II. Изучение структурно-функциональной организации сердца методом внутриклеточных отведений	188
Тема III. Электрокардиограмма: методы регистрации, анализ, формирование	191
Тема IV. Анализ экстракардиальных нервных влияний на сердце	200
Подтема 1. Изучение парасимпатических и симпатических нервных влияний на силу и частоту сердечных сокращений (регистрация механограммы)	207
Подтема 2. Анализ импульсной активности во внутрисердечных нервах лягушки при раздражении экстракардиальных путей	209
Тема V. Авторегуляторная функция внутрисердечной нервной системы.	213
Тема VI. Участие физиологически активных веществ в осуществлении нервных влияний на сердце	216
Тема VII. Кардио-кардиальные рефлексy	219
Тема VIII. Исследование характера и роли афферентной сигнализации в рефлекторной регуляции деятельности сердца	222
Подтема 1. Изучение типов афферентных залпов в сердечных ветвях вагосимпатических стволов лягушек	226
Подтема 2. Изучение роли приуроченности афферентных залпов к фазам сердечного цикла для парасимпатической рефлекторной регуляции сердца	228
Тема IX. Висцеро-кардиальные рефлексy на сердце с мочевого пузыря	231
Тема X. Нервная и гуморальная регуляция сердца и сосудов	234
Тема XI. Центральная регуляция деятельности сердца и сосудов	238
Подтема 1. Регуляция частоты сердечных сокращений, артериального давления и дыхания при нормальном поведении ненаркотизированной нефиксированной кошки и изучение эффектов на сердце у такого животного при раздражении гипоталамуса	245
Подтема 2. Изучение эффектов на сердце при раздражении гипоталамуса и выявление модулирующих влияний гипоталамуса на сердечно-сосудистые рефлексy у наркотизированных кошек	248
Тема XII. Нейрогенная автоматия лимфатических сердец амфибий. — Т. В. Лелекова, Ц. В. Сербенюк	255

Раздел VI.

ФИЗИОЛОГИЯ ПИЩЕВАРЕНИЯ. — Г. С. Ипполитова, Ц. В. Сербенюк

Тема I. Регуляция секреторной деятельности слюнных желез	271
Тема II. Операция малого желудка	272
	283

Тема III. Гуморальная регуляция секреторной деятельности поджелу- дочной железы	296
Тема IV. Операция выведения изолированного отрезка тонкой кишки по методу Тирн-Велла	301

Раздел VII

ЭНДОКРИНОЛОГИЯ. — Г. Д. Матарадзе, М. М. Никитина, В. Б. Розен, А. Н. Смирнов, О. В. Смирнова	305
--	-----

Тема I. Морфофизиологическая характеристика желез внутренней сек- реции	306
Тема II. Химические методы определения стероидных гормонов в био- логических жидкостях	318
Тема III. Белки, специфически связывающие гормоны, и сатурационный анализ гормонов	331

Раздел VIII

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ. — И. П. Баскова	343
------------------------------------	-----

Тема I. Общие методы, используемые при выполнении задач	350
Тема II. Контактная стадия свертывания крови	365
Тема III. Протромбин и его активация в тромбин	369
Тема IV. Превращение фибриногена в фибрин. Стабилизация фибрино- вого сгустка фактором XIIIa	374
Тема V. Активация плазминогена в плазмин. Фибринолиз	381
Тема VI. Нейрогуморальная регуляция свертывания крови	387
Тема VII. Тромбоз. Действие антитромботических и тромболитических препаратов	390
Тема VIII. Ингибиторы свертывания крови из кровососущих. Медицин- ская пиявка <i>Hirudo medicinalis</i>	394
Рекомендуемая литература	401

*Изольда Порфирьевна Баскова, Галина Семеновна Ипполитова,
Надежда Александровна Келарева и др.*

**БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Заведующий редакцией А. Г. Гаврилов. Научный редактор В. С. Фомин.
Редактор А. С. Орлова. Младшие редакторы Е. И. Попова, Е. Г. Самойло.
Художник Э. А. Марков. Художественный редактор Т. А. Коленкова.
Технический редактор З. В. Нуждина. Корректор С. К. Завьялова.

ИБ № 4295

Изд. № Е-418. Сдано в набор 13.01.84. Подп. в печать 14.06.84.
Формат 60×90¹/₁₆. Бум. тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая.
Объем 25,5 усл. печ. л. 25,5 усл. кр.-отт. 32,57 уч.-изд. л. Тираж 25 000 экз.
Зак. № 72. Цена 1 р. 50 к.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном
комитете СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли.
150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

